

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zu Vorkommen und Metabolismus von Myosmin  
und  
Chemopräventive Effekte von verschiedenen Tabakalkaloiden  
und tabakspezifischen Nitrosaminen auf den Stoffwechsel  
von *N*'-Nitrosonornikotin**

Stefan Tyroller

aus

Schrobenhausen

**2004**

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Elmar Richter im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie betreut. Als Fachvertreter vertritt Prof. Dr. Martin Biel die Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 8. März 2004

Dissertation eingereicht am 8. März 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Elmar Richter
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 17. Mai 2004

*Meinen Eltern*

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht und auf Kongressen präsentiert:**

### ***Veröffentlichungen***

Stefan Tyroller, Wolfgang Zwickenpflug, Elmar Richter

**New Sources of Dietary Myosmine Uptake from Cereals, Fruits, Vegetables, and Milk**

*J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4909-4915.

Stefan Tyroller, Wolfgang Zwickenpflug, Elmar Richter

**Synthesis of  $^{14}\text{C}$ -labelled myosmine, [2'- $^{14}\text{C}$ ]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridine**

*J. Label. Compd. Radiopharm.* **2003**, 46, 395-400.

Wolfgang Zwickenpflug, Stefan Tyroller, Elmar Richter

**Metabolism of Myosmine in Rats: Identification of the Main Metabolites**

*Chem. Res. Toxicol.*, submitted.

Stefan Tyroller, Wolfgang Zwickenpflug, Elmar Richter

**Effect of different tobacco alkaloids, TSNA and phenethyl isothiocyanate on *N*-Nitrosonornicotine metabolism in the F344 rat**

*Toxicology*, in Vorbereitung.

### ***Kongressbeiträge***

- Jährliches Treffen der *American Association for Cancer Research* (AACR) 2003 in Washington DC:

Wolfgang Zwickenpflug, Stefan Tyroller, Elmar Richter

**Metabolism of myosmine in rats**

*Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **2003**, 44 (2<sup>nd</sup> ed.), 80-81.

Susanna Glas, Kurt Steiner, Stefan Tyroller, Wolfgang Zwickenpflug, Elmar Richter

**Quantitative whole-body autoradiographic study of myosmine in rats**

*Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **2003**, 44 (2<sup>nd</sup> ed.), 875.

- Jährliches Treffen der *American Association for Cancer Research* (AACR) 2004 in Orlando, Florida:

Stefan Tyroller, Wolfgang Zwickenpflug, Elmar Richter

**Interactions of different tobacco-alkaloids and TSNA on NNN-metabolism in F344 rats**

*Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **2004**, 45, 741.

Wolfgang Zwickenpflug, Stefan Tyroller, Elmar Richter

**Peroxidation of myosmine as additional activation pathway**

*Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **2004**, 45, 743.

- Teilnahme an der Eurotox 2002 in Budapest

## INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis	
	Zusammenfassung	1
1	<b>Einleitung</b>	6
1.1	Krebserkrankungen, Epidemiologie	6
1.1.1	Lungenkrebs	9
1.1.2	Ösophaguskarzinom	11
1.2	Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese	14
1.3	Ernährung: Ursächliche und chemopräventive Wirkungen in der Kanzerogenese	16
1.4	Chemoprävention	17
1.5	Tabak und Tabakrauch	18
1.5.1	Tabakalkaloide	20
1.5.2	Biosynthese von Tabakalkaloiden	21
1.6	Nitrosamine	24
1.6.1	Gefahrenpotenzial der Nitrosamine	25
1.6.2	Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen	26
1.6.3	Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)	29
1.6.4	Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNN	32
1.6.5	Möglichkeiten zur Beeinflussung des TSNA-Stoffwechsels	34
1.6.6	Organspezifität von NNN und NNK	35
1.6.7	Die Rolle von Enzym polymorphismen beim TSNA-Metabolismus	36
1.7	Myosmin	37
1.7.1	Entdeckung, Vorkommen, Nachweismöglichkeiten	37
1.7.2	Synthese	38
1.7.3	Physikalisch-chemische und toxikologische Eigenschaften	39
1.7.4	Nitrosierung	40
1.7.5	Relevanz von Myosmin für die Kanzerogenese	41
1.8	Biomonitoring	42
1.8.1	Protein-Addukte	43
1.8.2	DNA-Addukte	44
1.8.2.1	Analyse von DNA-Addukten	46
1.8.3	TSNA-Addukte als Biomarker der Tabakexposition	47

---

2	<b>Material und Methoden</b>	50
2.1	Material	50
2.1.1	Geräte	50
2.1.2	Materialien	52
2.1.3	Reagenzien	53
2.1.4	Radiochemikalien	55
2.1.5	Puffer und Lösungen	55
2.2	Methoden	56
2.2.1	Synthesen	56
2.2.1.1	Myosmin, 3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin	56
2.2.1.2	HPB, 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon	56
2.2.1.3	Ketosäure, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure	57
2.2.1.4	Ketosäuremethylester, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäuremethylester	58
2.2.1.5	3-Pyridylelessigsäuremethylester	59
2.2.1.6	3'-Hydroxymyosmin	59
2.2.1.7	4'-Hydroxymyosmin	60
2.2.1.8	<sup>14</sup> C-markiertes Myosmin, [2'- <sup>14</sup> C]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridin	61
2.2.2	Nachweis von Myosmin in Lebensmitteln	63
2.2.2.1	Auswahl des Probenmaterials	63
2.2.2.2	Probenvorbereitung	64
2.2.2.3	Probenaufarbeitung	64
2.2.2.4	Qualitativer Nachweis mittels GC/MS	65
2.2.2.5	Quantitativer Nachweis mittels GC/MS	65
2.2.3	Metabolismus von Myosmin in Wistar-Ratten	68
2.2.3.1	Versuchstiere und Tierversuch	68
2.2.3.2	Verteilung der Radioaktivität auf Urin und Faeces	69
2.2.3.3	Bestimmung des Metabolitenspektrums im Urin	69
2.2.3.4	Identifizierung der Metaboliten	70
2.2.4	Untersuchungen zum Einfluss von Nikotin, Cotinin und PEITC auf den NNN-Metabolismus	72
2.2.4.1	Versuchstiere und Tierversuch	72
2.2.4.2	Radioaktivitätsverteilung in Urin und Faeces	73
2.2.4.3	Trennung der Urinmetaboliten	73
2.2.4.4	Identifizierung der Metaboliten im Urin	74

---

2.2.5	Versuche zur Beeinflussung des NNN-Stoffwechsels durch Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, <i>N'</i> -Nitrosoanatabin und <i>N'</i> -Nitrosoanabasin	74
2.2.5.1	Versuchstiere und Tierversuch	74
2.2.5.2	Quantifizierung der ausgeschiedenen Radioaktivität in Urin und Faeces	75
2.2.5.3	Chromatographische Trennung der Metaboliten im Urin	75
2.2.5.4	Identifizierung der Urinmetaboliten	76
2.3	Statistische Auswertung	76
3	<b>Ergebnisse</b>	78
3.1	Synthesen	78
3.1.1	HPB, 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon	78
3.1.2	<sup>14</sup> C-markiertes Myosmin, [2'- <sup>14</sup> C]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridin	80
3.2	Nachweis von Myosmin in Nahrungsmitteln	83
3.2.1	Analytik	83
3.2.1.1	GC/MS-Verfahren	83
3.2.1.2	Identifizierung des Myosmins im Rahmen der GC/MS-Messung	83
3.2.1.3	Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen von Myosmin und D <sub>4</sub> -Myosmin	84
3.2.1.4	Bestimmung von Wiederfindungsraten	85
3.2.2.	Auswahl der Lebensmittel	86
3.2.3	Identifizierung von Myosmin in Nahrungsmittelproben	87
3.2.4	Quantifizierung von Myosmin in Lebensmitteln	89
3.3	Myosmin-Metabolismus in Wistar-Ratten	93
3.3.1	Applikation und Probengewinnung	93
3.3.2	Elimination von Myosmin über Urin und Faeces	93
3.3.3	Erfassung des Metabolitenspektrums	95
3.3.4	Identifizierung der Metaboliten	97
3.3.4.1	Hauptmetaboliten	97
3.3.4.2	Weitere Metaboliten	105
3.4	Einfluss von Nikotin, Cotinin und PEITC auf den NNN-Metabolismus	113
3.4.1	Versuchsdurchführung und Gewinnung von Urin und Faeces	113
3.4.2	Ausscheidung der Radioaktivität über Urin und Faeces	114
3.4.3	Metabolitenspektrum von NNN	115
3.4.4	Veränderungen im Metabolitenspektrum durch Co-Administration von Nikotin, Cotinin und PEITC	117
3.4.4.1	Nikotin	117



---

3.4.4.2	Cotinin	118
3.4.4.3	PEITC	118
3.5	Einfluss von Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, <i>N'</i> -Nitrosoanatabin und <i>N'</i> -Nitrosoanabasin auf den NNN-Stoffwechsel	120
3.5.1	Applikation und Gewinnung von Urin- und Faecesproben	120
3.5.2	Eliminationskinetik von [5- <sup>3</sup> H]-NNN	120
3.5.3	Zuordnung der NNN-Metaboliten	121
3.5.4	Auswirkungen auf das Metabolitenspektrum von [5- <sup>3</sup> H]-NNN durch Co-Administration von Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, <i>N'</i> -Nitrosoanatabin und <i>N'</i> -Nitrosoanabasin	123
3.5.4.1	Nornikotin	124
3.5.4.2	Anatabin	124
3.5.4.3	Anabasin	125
3.5.4.4	Myosmin	126
3.5.4.5	<i>N'</i> -Nitrosoanatabin	126
3.5.4.6	<i>N'</i> -Nitrosoanabasin	127
4	<b>Diskussion</b>	129
4.1	Synthesen	129
4.2	Myosmin in Nahrungsmitteln	131
4.3	Dosisabhängiger Myosmin-Metabolismus bei Wistar-Ratten	135
4.4	Einfluss von Tabakalkaloiden, TSNA und PEITC auf den NNN-Stoffwechsel bei F344-Ratten	140
5	<b>Literaturverzeichnis</b>	144

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AB	Anabasin
AC	Adenokarzinom
AEG	Adenokarzinom des ösophageal-gastralen Übergangs
AT	Anatabin
BMI	Body Mass Index
COT	Cotinin
CTA	adjuvante Chemotherapie
d	Tag(e)
DAD	Diode Array Detection
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	decay per minute, radioaktiver Zerfall pro Minute
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETS	environmental tobacco smoke
EU	Europäische Union
GC	Gaschromatographie
GERD	gastroösophageale Refluxerkrankung
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HPB	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon, Ketoalkohol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Hauptstromrauch
Hydroxysäure	4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-butansäure
I.D.	Innendurchmesser
IARC	International Agency for Research on Cancer
<i>iso</i> -NNAC	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butansäure
<i>iso</i> -NNAL	4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol
ISTD	interner Standard
KG	Körpergewicht
Ketosäure	4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure
M	molar
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
min	Minute(n)

MS	Massenspektroskopie
MYO	Myosmin
NAB	<i>N'</i> -Nitrosoanabasin
NAT	<i>N'</i> -Nitrosoanatabin
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NIC	Nikotin
NICI	negative ion chemical ionisation
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	nicotine derived nitrosamino ketone = 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	<i>N'</i> -Nitrosonornicotin
NPRO	<i>N</i> -Nitrosoprolin
NRN	Nornikotin
NS	Nebenstromrauch
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PEITC	$\beta$ -Phenylethylisothiocyanat
R <sub>f</sub>	relative Wanderungsgeschwindigkeit, Rückhaltefaktor
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed Phase
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
S.D.	standard deviation (Standardabweichung)
S.E.	standard error (Standardabweichung vom Mittelwert)
SCC	squamous cell carcinoma, Plattenepithelkarzinom
SIM	Single Ion Monitoring (=SIR)
SPE	Solid-phase extraction, Festphasenextraktion
TMS	Tetramethylsilan
TSNA	tabakspezifische Nitrosamine
UV	Ultraviolett-Spektroskopie

## ZUSAMMENFASSUNG

### *Myosmin*

Myosmin (3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin) wurde lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid angesehen. Eine Exposition des Menschen wäre demnach nur nach Konsum von Tabakprodukten oder durch Passivrauchbelastung gegeben. Erste Untersuchungen an Nüssen und Nussprodukten haben diese Einschränkung aufgehoben. In weiteren Studien konnte die rasche Nitrosierung von Myosmin zu 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) und *N*'-Nitrosonornikotin (NNN) gezeigt werden. NNN erhöht im Tierversuch bei Ratten die Inzidenz von Ösophagustumoren. Nach Nitrosierung von Myosmin unter Bedingungen, wie sie unter anderem im menschlichen Magen zu finden sind, konnte eine kovalente Bindung an DNA nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Exposition mit Myosmin durch bloße Nahrungsaufnahme noch erheblich wahrscheinlicher geworden ist und wohl weltweit jeder Mensch Myosmin inkorporiert. Da Myosmin ausschließlich dem Tabak zugerechnet wurde und darin nur in kleinen Mengen vorkommt, stand es lange Zeit im Schatten vermeintlich potenterer Verbindungen und war deshalb nicht Gegenstand intensiver Forschung. So wurden bislang auch keine Untersuchungen zum dosisabhängigen Stoffwechsel dieses Alkaloids durchgeführt. Aufgrund seiner unter den Tabakalkaloiden einzigartigen Imin-Struktur könnten sich neue, direktere Wege der metabolischen Aktivierung – auch auf rein chemischem Weg ohne enzymatische Beteiligung – erschließen.

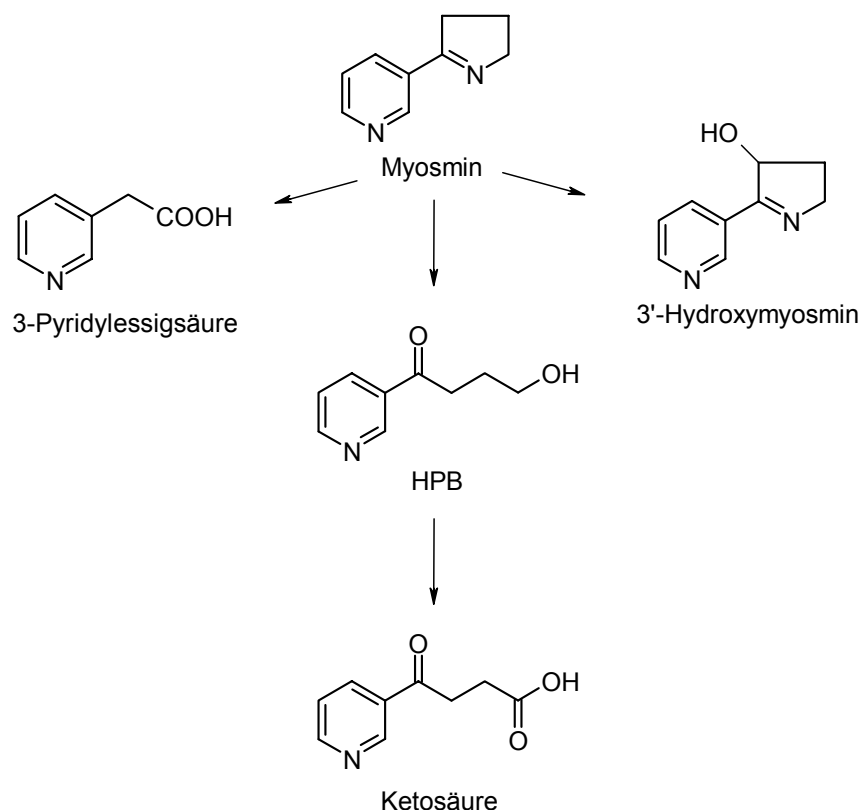
- Myosmin-Analytik in Lebensmitteln

Um eine größere Variabilität in den zu untersuchenden Nahrungsmitteln zu ermöglichen wurde die Analytik für Nussprodukte grundlegend variiert. Die Palette an untersuchten Lebensmitteln umfasste letztlich nicht nur Grundnahrungsmittel (Weizen, Reis, Mais, Hirse, Kartoffel, Milch), sondern auch Obst (Apfel, Ananas, Kiwi, Banane, Mandarine, Zitrone), Gemüse (Tomate, Karotte, Salat, Spinat, Gurke, Zwiebel, Weintrauben) und Genussmittel (Kakao, Sahne). Nach diversen Filtrations- und Anreicherungsschritten konnte Myosmin in Konzentrationen zwischen 0,02 ng/g und 6,1 ng/g mittels GC/MS-Analytik in folgenden Lebensmittelproben nachgewiesen werden: Reis, Polentamais, Popcornmais, Weizenmehl, Hirse, Kartoffel, Tomate, Kakao, Milch, Sahne, Karotte, Apfel, Ananas und Kiwi. Verschiedene Zubereitungsarten hatten bei ausgewählten Grundnahrungsmitteln keinen

Myosmin-Verlust zur Folge. Auch war keine besondere Belastung des Schalenmaterials im Vergleich zur restlichen Fruchtmasse erkennbar. Damit unterscheidet sich das Vorkommen von Myosmin grundsätzlich von dem des Nikotins, welches sich nach bisherigen Erkenntnissen auf die Tabakpflanze und in geringem Maß auf andere Pflanzen der Familie *Solanaceae* beschränkt.

- Dosisabhängiger Metabolismus von Myosmin in Wistar Ratten

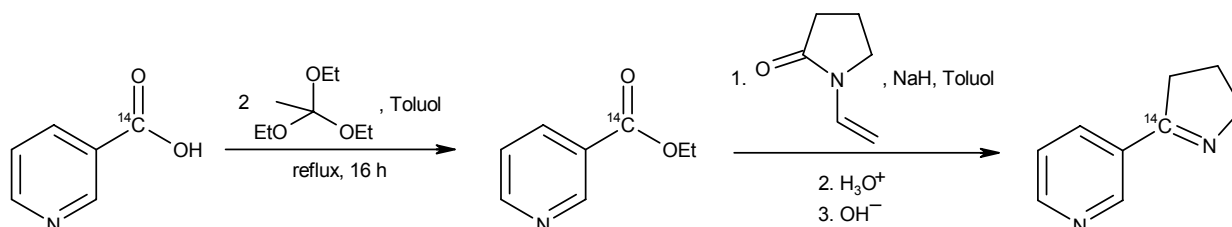
Dem Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln wurde bei der Versuchsvorbereitung zum dosisabhängigen Metabolismus von Myosmin Rechnung getragen: Die niedrigen Dosierungen orientierten sich an realistischen Aufnahmemengen beim Menschen, die hohen Dosierungen waren für die Identifizierung der Metaboliten notwendig. Die perorale Applikation berücksichtigt einen möglichen Beitrag von Mundhöhle und Ösophagus zum Metabolismus von Myosmin. Je vier Tieren wurde mittels eines präparierten Apfelstücks [ $5\text{-}^3\text{H}$ ]-Myosmin in den Dosierungen 0,001, 0,005, 0,5 und 50  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht verabreicht. In definierten Zeitintervallen wurden Urin und Faeces gesammelt. Die applizierte Radioaktivitätsmenge konnte nach 48 h fast vollständig in den Urin- und Faecesproben wiedergefunden werden. Der Anteil der Radioaktivität, die auf den Urin entfiel, nahm von >85% bei den niedrigeren Dosierungen auf 75% bei der höchsten Dosierung ab.



Das Metabolitenspektrum im Urin zeigte zwei Hauptsignale, die zusammen circa 75% der über den Urin ausgeschiedenen Radioaktivität ausmachen, und etwa fünf weitere Signale. Der Hauptmetabolit mit >52% konnte als 4-(3-Pyridyl)-4-oxobutansäure (Ketosäure) identifiziert werden. Aus anderen Metabolismusstudien zu Tabakinhaltsstoffen zwar bekannt, jedoch bezüglich des nachgewiesenen Anteils von circa 23% ein Novum, konnte 3-Pyridylelessigsäure als zweiter Metabolit charakterisiert werden. Darüber hinaus konnten zwei Signale mit geringer Intensität HPB und 3'-Hydroxymyosmin zugeordnet werden. Da letztere Verbindung nach bisherigem Wissen einzig aus Myosmin entsteht, könnte 3'-Hydroxymyosmin als Biomarker für eine Myosmin-Exposition Verwendung finden. Weitere Untersuchungen zu diesem Vorhaben stehen noch aus.

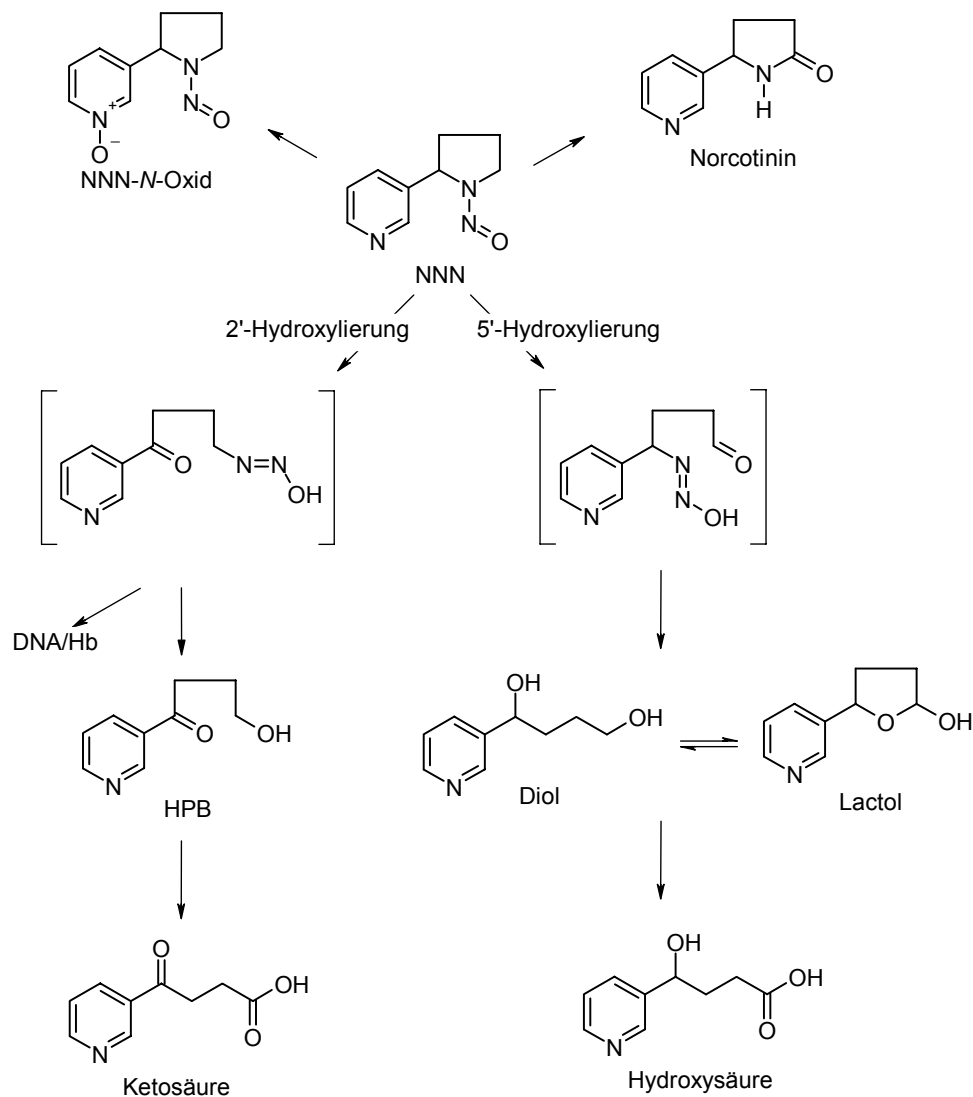
- Synthese von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Myosmin, [2'- $^{14}\text{C}$ ]-3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin

Für die Durchführung eines Autoradiographie-Projekts wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes Myosmin benötigt. Ältere Synthesevorschriften gehen von Nikotinsäureethylester als Edukt aus. Da diese Substanz kommerziell nicht  $^{14}\text{C}$ -markiert erhältlich ist wurde Carboxyl- $^{14}\text{C}$ -Nikotinsäure verwendet und eine Synthese für den Mikromaßstab entwickelt. Die Veresterung erfolgte durch Reaktion mit 2 eq. 1,1,1-Triethoxyethan in Toluol und lieferte einen quantitativen Umsatz. Dadurch war es möglich die komplette Synthese im gleichen Lösungsmittel und ohne Aufreinigung eines Zwischenprodukts durchzuführen. Der Ester wurde mit *N*-Vinyl-2-pyrrolidon umgesetzt und das Endprodukt an Kieselgel aufgereinigt. Tracer-Experimente ergaben eine Ausbeute von 53%, wogegen aufgrund von Verunreinigungen der  $^{14}\text{C}$ -Nikotinsäure der eigentliche Reaktionsansatz nur 15% Ausbeute lieferte. Man erhielt 130  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Myosmin mit einer spezifischen Aktivität von 55,2 mCi/mmol und einer radiochemischen Reinheit von 96,8%.



### *N'*-Nitrosonornikotin (NNN)

NNN war das erste tabakspezifische Nitrosamin (TSNA) mit kanzerogenem Potenzial, das im Tabakrauch nachgewiesen wurde. Der Metabolismus verläuft unter anderem über 2'- und 5'-Hydroxylierung. Nach erfolgter 2'-Hydroxylierung werden verschiedene instabile Zwischenstufen durchlaufen. Unter anderem entsteht das reaktive 4-(3-Pyridyl)-4-oxobutan-1-diazohydroxid, welches nach Zerfall und Bildung einer elektrophilen Spezies für die kovalente Bindung an DNA und die im Tierversuch damit verbundene Entstehung von Tumoren in den Atemwegen und dem Ösophagus verantwortlich gemacht wird. Bislang konnte ein solcher Mechanismus nur für die 2'- nicht aber für die 5'-Hydroxylierung gezeigt werden.



Da auf den unterschiedlichen Stoffwechselwegen verschiedene Metaboliten gebildet und ausgeschieden werden, kann man aus deren relativer Verteilung auf ein entsprechend vermindertes oder erhöhtes Krebsrisiko schließen. Metaboliten, die nach 2'-Hydroxylierung

entstehen, sind HPB und Ketosäure. 4-(3-Pyridyl)butan-1,4-diol (Diol) und 4-(3-Pyridyl)-4-hydroxybutansäure (Hydroxysäure) resultieren dagegen aus vorheriger 5'-Hydroxylierung.

Gleichzeitig verabreichte Substanzen können den Metabolismus einer Verbindung auf verschiedenste Weise beeinflussen. Solche Studien wurden bereits mit einem anderen TSNA, dem starken Lungenkanzerogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) durchgeführt. Dabei zeigten diverse Tabakalkaloide und Nahrungsmittelbestandteile (z.B.  $\beta$ -Phenylethylisothiocyanat, PEITC) einen hemmenden Effekt auf die NNK-Aktivierung im Sinne einer Chemoprävention. Mit NNN wurden bislang nur wenige *in vitro* und *in vivo* Wechselwirkungsversuche durchgeführt, wobei die verwendeten Mengen sich meist nicht an real vorkommenden Expositionsverhältnissen orientierten.

- Einfluss der gleichzeitigen Applikation verschiedener Tabakalkaloide, TSNA und PEITC auf den NNN-Metabolismus in F344 Ratten

<sup>3</sup>H-Markiertes NNN wurde zeitgleich mit verschiedenen Tabakalkaloiden, TSNA und PEITC an Gruppen zu je vier bzw. acht F344 Ratten appliziert. Getestet wurden Nikotin, Cotinin, PEITC, Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, *N'*-Nitrosoanatabin und *N'*-Nitrosoanabasin gegenüber Kontrolltieren, die nur NNN erhielten. PEITC wurde dem Futter beigemischt, alle anderen Substanzen wurden ebenso wie NNN subcutan verabreicht. Die applizierten Mengen bewegten sich in Größenordnungen der real anzutreffenden Exposition nach Genuß von Tabakprodukten. In definierten Zeitintervallen wurden Urin und Faeces gesammelt. Die gemessenen Radioaktivitätsmengen in Urin und Faeces geben Aufschluss über den generellen Eliminationsweg von NNN bzw. der gebildeten Metaboliten. Keine der getesteten Substanzen beeinflusste das Verhältnis im Vergleich zur Kontrollgruppe von ca. 91% Ausscheidung über Urin und 9% über Faeces. Das Metabolitenspektrum im Urin wurde mittels radio-HPLC ausgewertet und der Anteil der einzelnen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität ermittelt. Co-Administration von Nikotin, Cotinin, Nornikotin und PEITC verringerte signifikant die Bildung von Ketosäure bei gleichzeitig signifikanter Zunahme der Hydroxysäure. Bei isolierter Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen kann daher von einem geringfügig verringerten kanzerogenen Potenzial von NNN bei gleichzeitiger Aufnahme dieser vier Substanzen ausgegangen werden. In Realität treten die untersuchten Stoffe jedoch nicht einzeln in Wechselwirkung, sondern es interagieren zum Beispiel im Tabakrauch tausende Substanzen gleichzeitig.



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Krebserkrankungen, Epidemiologie

Der Mensch sieht sich zeitlebens mit einer Vielzahl von Krebsrisikofaktoren konfrontiert (Abbildung 1-1). Grundsätzlich ist zwischen individuell vermeidbaren Risiken, wie falsche Ernährung und Tabakgenuss, und nicht beeinflussbaren Größen zu unterscheiden. Zu letzterem zählen unter anderem genetisch bedingte Krebsrisikofaktoren (Doll, 1996).

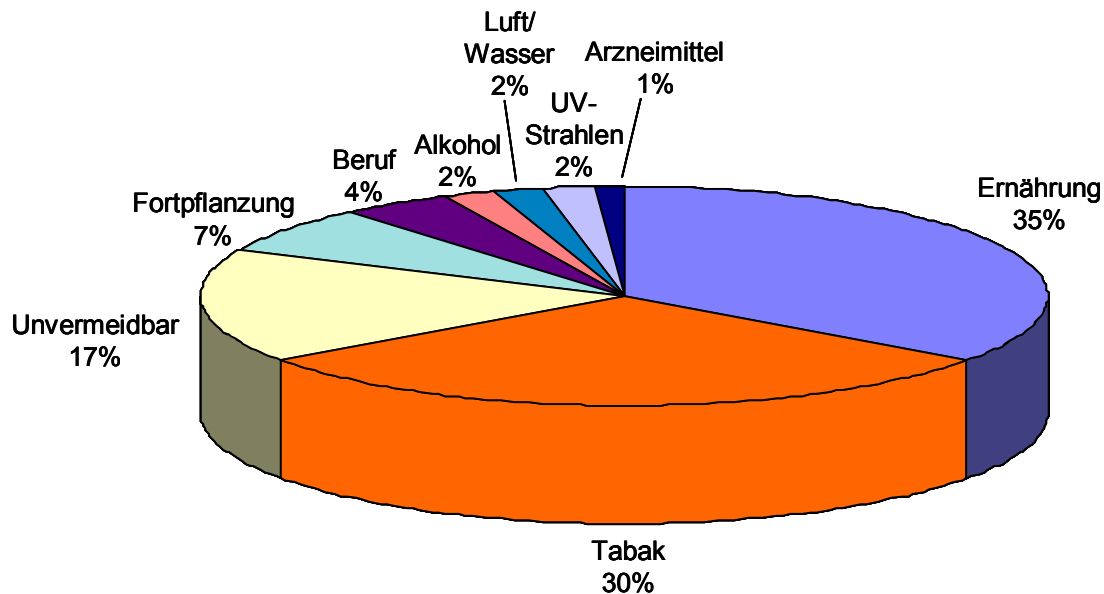


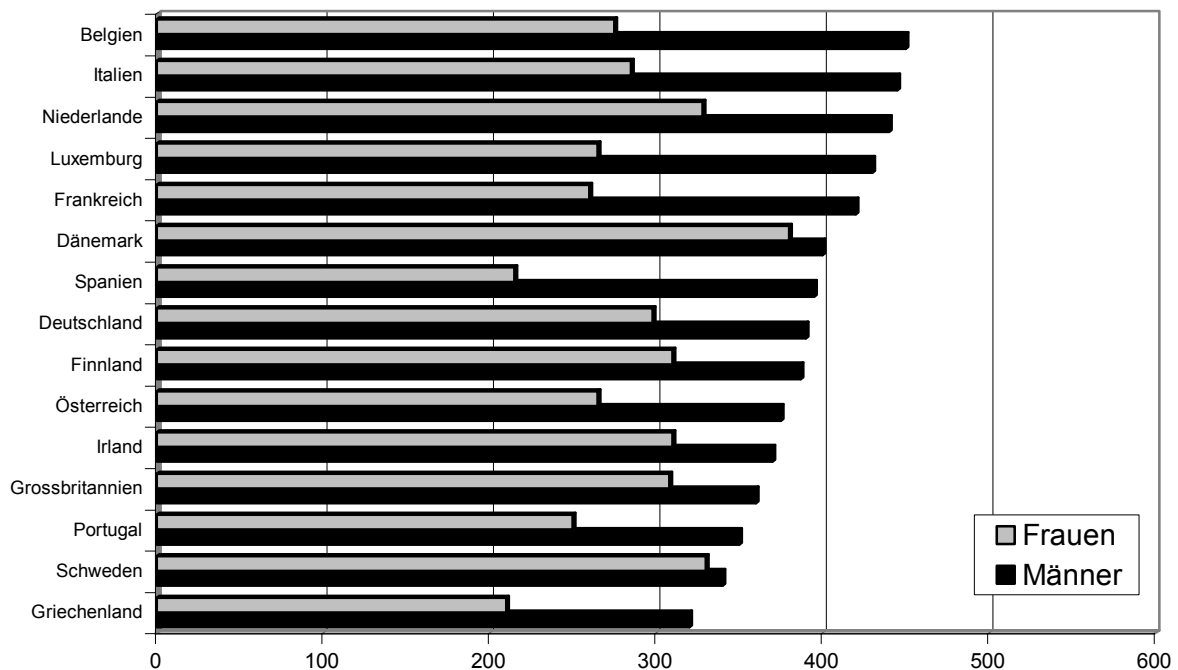
Abbildung 1-1: Krebsrisikofaktoren

Maligne Tumoren bzw. Krebs gehören neben Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Trotz umfangreicher Forschung und ständig verbesserter Therapie steigt die Zahl der durch Krebserkrankungen hervorgerufenen Todesfälle ständig an. So verstarben im Jahre 1990 bereits 24,9% der Männer und 22,3% der Frauen in Europa an Krebs, während die Todesfälle durch Herz-Kreislaufkrankungen bei 45,1% bzw. 53,3% stagnierten (Geddes et al., 1994).

Allein 1998 erkrankten in Deutschland schätzungsweise 347 000 Menschen an malignen Tumoren, 212 353 sind daran gestorben. Während bei den Neuerkrankungen der Anteil der Männer bei 48,5% liegt, beträgt dieser bei den Sterbefällen 51,2% (Anon, 2002).

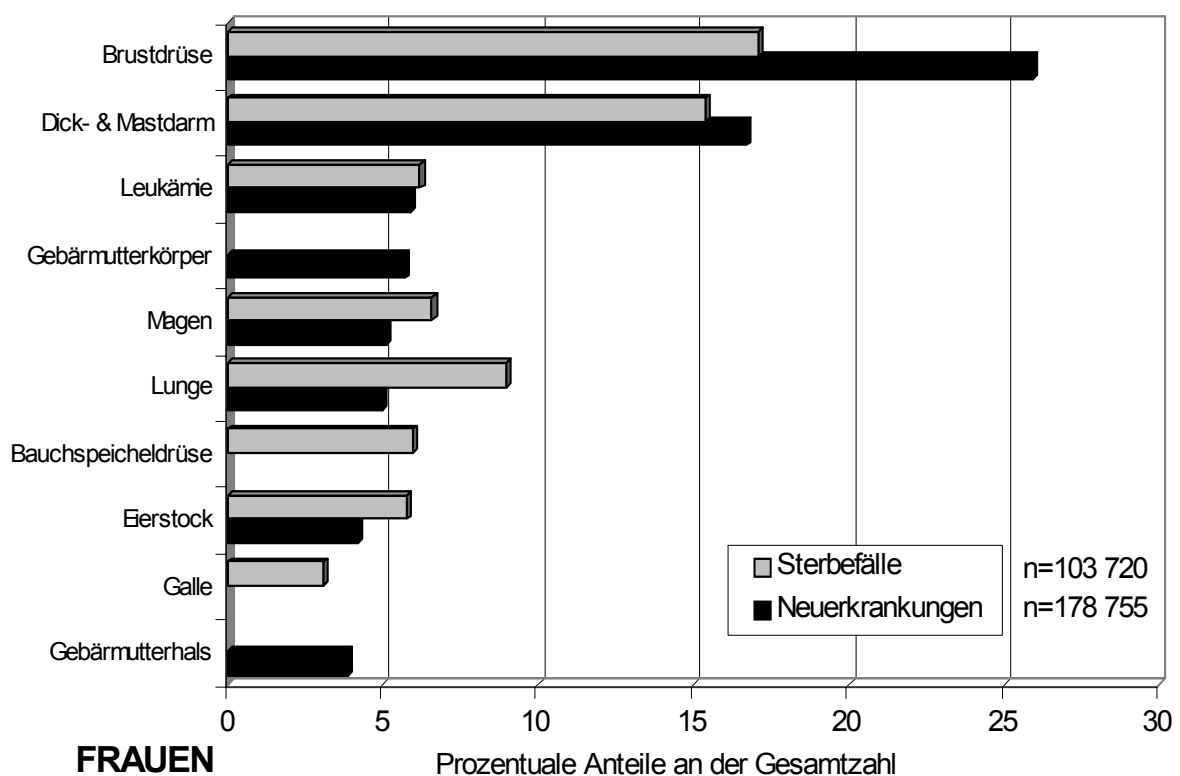
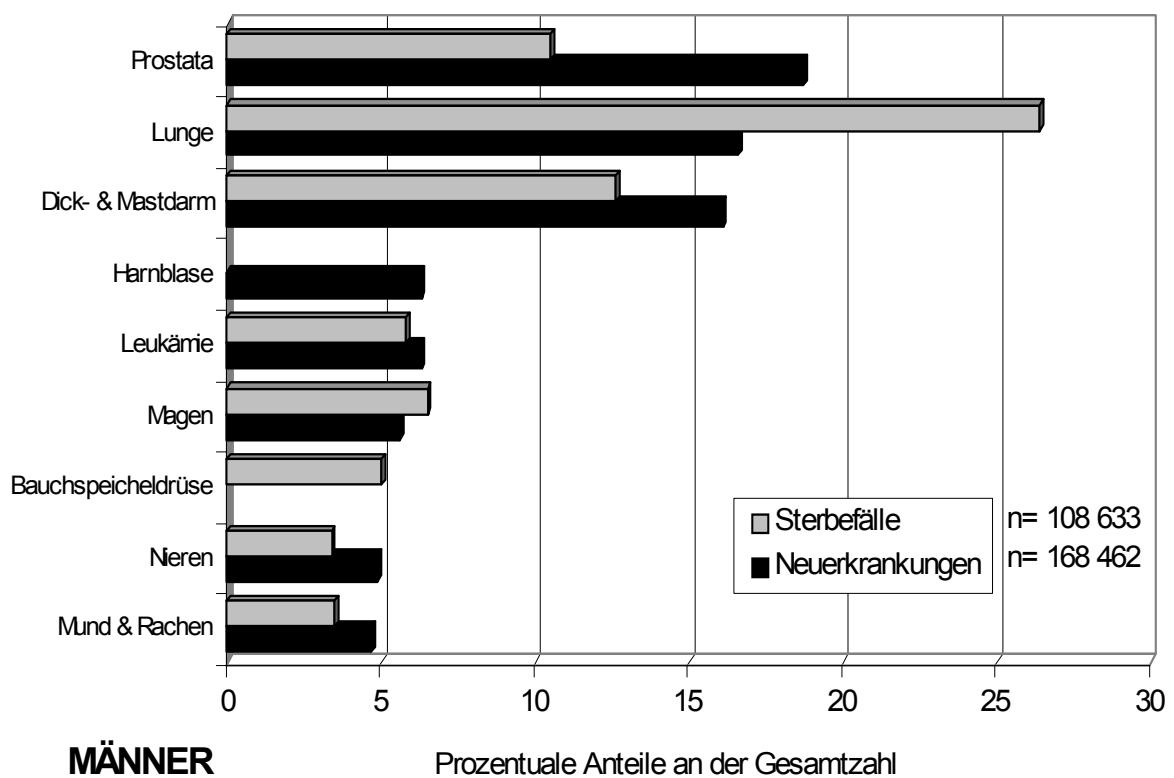
Im EU-Vergleich liegen die altersstandardisierten Inzidenzraten für Deutschland nach Schätzung des RKI für Frauen etwas über (6. Platz von 15 Staaten), für Männer (8. Platz) geringfügig unterhalb des Durchschnitts. Höhere Inzidenzraten für Männer bestehen vor

allem in Belgien, Italien, den Niederlanden, Luxemburg und Frankreich, niedrigere für Frauen in Frankreich, Portugal, Spanien und Griechenland (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Inzidenz bösartiger Neubildungen in Europa bei Männern und Frauen (altersstandardisierte Neuerkrankungsrate pro 100 000 Einwohner [Europastandard] gemäß Ferlay et al., 1999), sortiert nach der Inzidenz bei den Männern**

Die Lokalisation der Tumoren hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte deutlich verändert. Während die Häufigkeit der Neuerkrankungen an Magenkrebs und die Mortalität durch Hoden- und Prostatakrebs deutlich abgenommen haben, ist neben Kolon-, Rektum- und Brustkrebs vor allem der Hautkrebs stark auf dem Vormarsch. Abweichungen von diesen Trends in den jährlichen Angaben basieren in erster Linie auf unterschiedlichen Erhebungen der Daten. Häufig werden unter anderem Geschlechtsunterschiede nicht ausreichend berücksichtigt (Statistisches Bundesamt, 1991). Abbildung 1-3 zeigt eine nach Geschlecht getrennte Aufstellung von Neuerkrankungen und Sterbefällen an verschiedenen Tumorarten. So ist die Prostata zwar einerseits das beim Mann mit 18,7% am häufigsten von malignen Tumoren befallene Gewebe, der Anteil an den Sterbefällen beträgt dagegen nur 10,5%. Die Statistik verdeutlicht auch die hohe Sterblichkeit durch Lungenkrebs, der 1998 zwar nur 16,6% der Neuerkrankungen, aber 26,4% der Sterbefälle ausmachte. Von besonderer Bedeutung bei dieser Betrachtung ist die unterschiedliche Altersstruktur der diversen Krebsarten, aber auch die geschlechtsspezifischen Unterschiede.



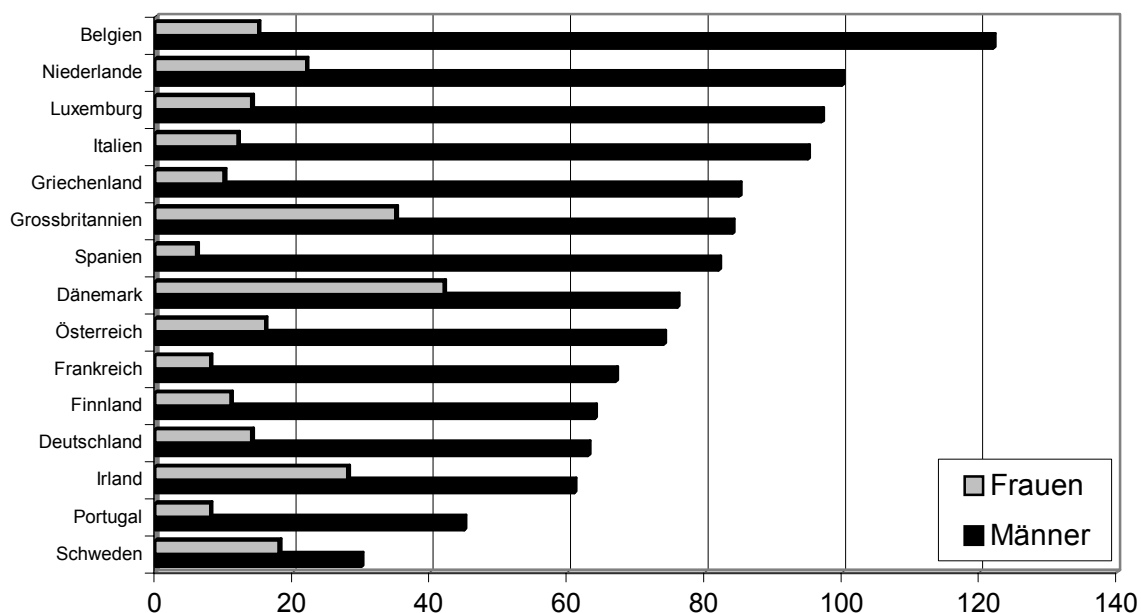
**Abbildung 1-3: Prozentualer Anteil der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland hinsichtlich Neuerkrankungsfällen und Sterbefällen, jeweils sortiert nach dem Anteil der Neuerkrankungen (Anon, 2002)**

Generell zeigt sich beispielsweise unter alleiniger Berücksichtigung der Altersklasse von 15 bis 70 Jahre, dass die Sterblichkeit hier mit 43,1% gegenüber 31,3% ein deutliches Übergewicht im weiblichen Geschlecht hat (Akermann, 1994). In der Tumor-Alters-Spezifizierung wiederum wird unter anderem deutlich, dass Neuerkrankungen der Schilddrüse zu 40-47% bei Menschen unter 60 Jahren auftreten, während maligne Entartungen der Lunge zu 70-80% erst in Altersklassen über 60 Jahren auftreten.

Somit ist zur detaillierten Beschreibung einer Krebsart unbedingt eine Einzelcharakterisierung ihrer Eigenheiten und des typischen Verlaufs notwendig.

### 1.1.1 Lungenkrebs

Der Lungenkrebs ist in Deutschland 1998 erstmalig vom Prostatakrebs als häufigste Krebsneuerkrankung bei den Männern abgelöst worden. Dennoch macht er mit 27 900 Neuerkrankungen beim Mann und 8 900 Neuerkrankungen bei der Frau etwa ein Sechstel aller Krebserkrankungen aus. Im EU-Vergleich der Inzidenz für Lungenkrebs zeigt sich Deutschland im unteren (Männer; Platz 12 von 15) bzw. mittleren Bereich (Frauen; Platz 8) (Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4: Inzidenz bösartiger Neubildungen der Lunge in Europa bei Männern und Frauen (altersstandardisierte Neuerkrankungsrate pro 100 000 Einwohner [Europastandard] gemäß Ferlay et al., 1999), sortiert nach Männern**

Lungenkrebs gehört zu den bösartigen Tumoren, für die der Hauptrisikofaktor seit langem belegt ist. Bei Männern sind bis zu 90%, bei Frauen bis zu 80% der Lungenkrebserkrank-

kungen auf das aktive Rauchen zurückzuführen. Dabei steigt das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Dauer des Rauchens, sowie der Inhalationstiefe. Zwar zeigt sich einerseits eine Abnahme des Risikos mit zunehmendem Abstand zur Aufgabe des Rauchens, doch birgt die Latenzzeit von ungefähr 20 Jahren eine lange währende Unsicherheit. Ein deutlich geringerer Teil aller Lungenkrebsfälle wird auf berufliche Exposition gegenüber verschiedenen kanzerogenen Stoffen (Asbest, Arsen-, Chrom- und Nickelverbindungen, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) zurückgeführt. Synergistische Effekte von Schadstoffen und Rauchen sind nachgewiesen (Richter und Scherer, 2004). Ein Zusammenhang mit der Luftverschmutzung ist dagegen bisher nicht belegt.

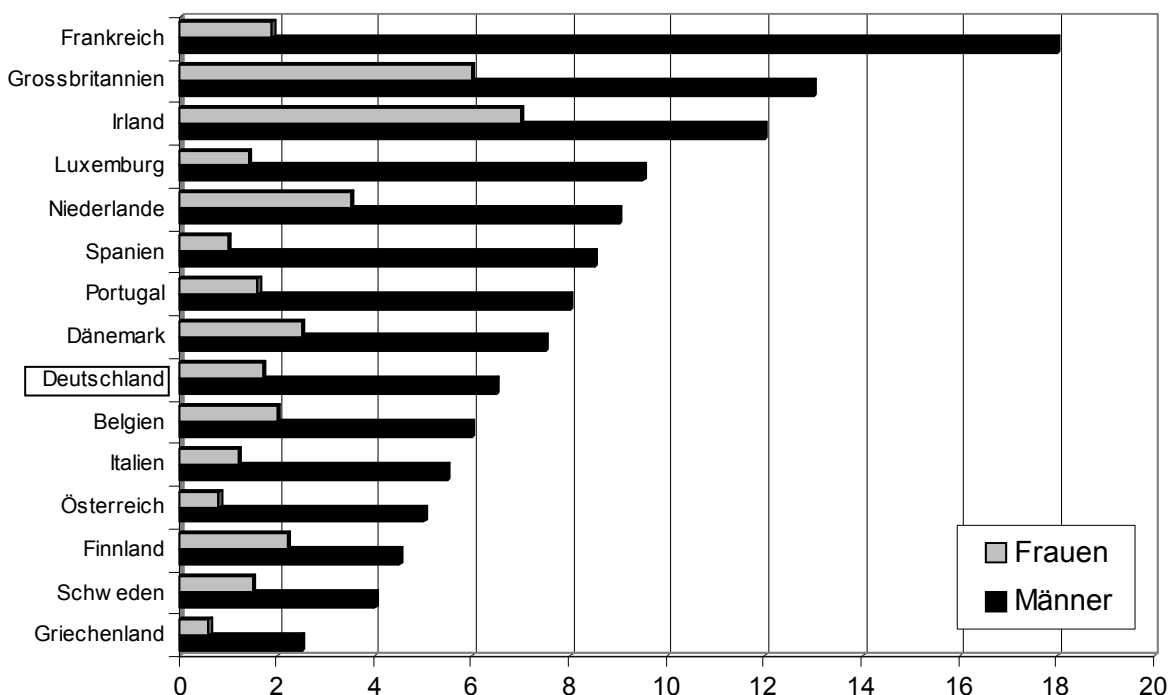
Während die Inzidenz bei Männern in Deutschland seit Mitte der 80er Jahre wieder rückläufig ist, steigt diese bei den Frauen weiterhin kontinuierlich an. Diese Trendentwicklung korreliert eindeutig mit den veränderten Rauchgewohnheiten bei Frauen und Männern. Die Altersstruktur dagegen zeigt nur geringe geschlechtsspezifische Unterschiede. Bei diesen Betrachtungen muss die lange Latenzzeit dieser Erkrankung berücksichtigt werden. Die Inzidenz von Lungenkrebs bei Männern und Frauen ist in den Ländern nahezu gleich, in denen schon im Vergleich zu Deutschland früher eine Anpassung des Rauchverhaltens von Frauen an das der Männer stattgefunden hat. Dies kann zum Beispiel in den USA beobachtet werden (Becker et al., 2001).

Lungenkrebs gehört trotz vieler Therapieverbesserungen noch immer zu den prognostisch ungünstigsten Krebsformen. Die relative Überlebensrate mit Lungenkrebs ist mit etwa 9% bei Männern schlechter als für Frauen (17%). Für einen Lungenkrebspatienten in Deutschland beträgt der Verlust an Lebenserwartung im Durchschnitt 12 bis 13 Jahre.

Bemerkenswert ist die Verschiebung der Verhältniszahlen für histologisch unterschiedliche Lungenkrebsarten. Die beiden wichtigsten Arten sind das Plattenepithelkarzinom (squamöses Karzinom) und das Adenokarzinom. In den sechziger Jahren war in den USA das Verhältnis von Plattenepithelkarzinom zu Adenokarzinom bei Männern 3,1 zu 1, bei Frauen dagegen 1 zu 1,6. Dieses Verhältnis hat sich bis zum Jahre 1990 auf nur mehr 1,1 zu 1 bei Männern und auf 1 zu 1,8 bei Frauen verlagert. In Europa überwiegt bei Männern nach wie vor das Bronchialkarzinom (2,8 zu 1) und bei Frauen ist die Dominanz des Adenokarzinoms (1 zu 1,2) geringer. Die Zunahme der Adenokarzinome wird mit den Veränderungen der Zigarette erklärt, die zu einer starken Reduktion von Teer und Nikotin im Rauch geführt haben. Die genauen Zusammenhänge sind jedoch bisher nicht bekannt (Hoffmann et al., 2001).

### 1.1.2 Ösophaguskarzinom

An Ösophaguskrebs erkrankten 1998 in Deutschland jährlich 3 100 Männer und 884 Frauen (Anon, 2002). Dies entspricht einem Anteil von weniger als 2% aller bösartigen Neubildungen bei Männern und knapp einem halben Prozent bei Frauen. Am höheren Anteil unter den Sterbefällen (3 bzw. 1%) wird die schlechte Prognose bei dieser Krebslokalisation deutlich. Männer erkranken aber nicht nur häufiger an Speiseröhrenkrebs, sondern auch im Mittel 8 Jahre früher als Frauen. Im EU-Vergleich (Abbildung 1-5) liegt Deutschland im Mittelfeld.



**Abbildung 1-5: Inzidenz bösartiger Neubildungen des Ösophagus in Europa bei Männern und Frauen (altersstandardisierte Neuerkrankungsrate pro 100 000 Einwohner [Europastandard] gemäß Ferlay et al., 1999), sortiert nach Männern**

Die Überlebensraten von Patienten mit Ösophaguskarzinom gehören zu den ungünstigsten aller Krebsarten. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate erreicht bei Männern etwa 7% und bei Frauen 4%. Die Ursache liegt unter anderem in der meist späten Diagnose begründet. Die Feststellung eines Frühkarzinoms ist in der Regel eine endoskopische Zufallsdiagnose. Radiologisch werden diese Tumoren nicht erfasst. Das Hauptsymptom Dysphagie tritt gewöhnlich erst bei Verlegung von mehr als zwei Dritteln des Lumens auf. Zu diesem Zeitpunkt ist der Tumor in aller Regel bereits inkurabel.

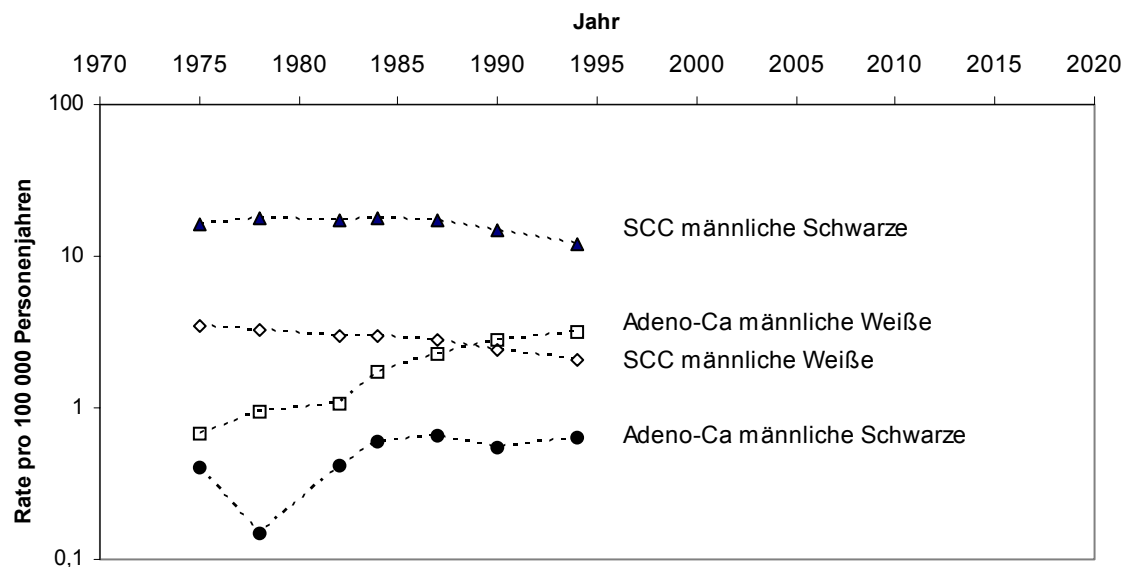
Die malignen epithelialen Tumoren in allen Bereichen des Ösophagus werden unabhängig vom histologischen Typ zusammenfassend als Ösophaguskarzinom bezeichnet. Man unterscheidet zwei Haupttypen von Ösophaguskarzinomen, das Plattenepithelkarzinom und das vom Drüsengewebe ausgehende meist auf den distalen Ösophagus beschränkte Adenokarzinom. In den westlichen Industrienationen hat dieser Tumortyp in den letzten drei Jahrzehnten den höchsten Anstieg in der Inzidenz aller Tumorarten gezeigt.

Bei distalen Adenokarzinomen spricht man von einem Ösophaguskarzinom, wenn sich das Zentrum des Tumors im Bereich von 5 cm distal oder proximal zum Mageneingang befindet. In diesem Bereich werden die Tumoren in drei Typen eingeteilt, die in Tabelle 1-1 genauer charakterisiert werden (Siewert et al., 1987; Siewert und Stein, 1996; Siewert und Stein, 1998).

**Tabelle 1-1: Einteilung der Tumoren anhand ihrer Lokalisation**

AEG Typ I	Adenokarzinom des distalen Ösophagus, üblicherweise aus dem Bereich spezialisierter intestinaler Metaplasie (z.B. Barrett's Ösophagus), der in die Magenöhle hineinragen kann
AEG Typ II	Echtes Karzinom der Cardia, stammt aus Cardiaepithel oder kurzen Abschnitten intestinaler metaplasierter Zellen aus dem Übergangsbereich von Ösophagus zur Cardia
AEG Typ III	Unterhalb der Cardia entstammender Tumor, der den Ösophagus-Magen-Übergang infiltriert und in den Ösophagus hineinragen kann

Die Unterteilung in die beiden Tumorarten ist besonders unter epidemiologischen Gesichtspunkten von Bedeutung. Allgemein erkrankten nach einer Untersuchung in den USA etwa 3 mal mehr Menschen schwarzer Hautfarbe an Ösophaguskrebs, als Weiße (Anon, 1998). Im Zeitraum von 1974 bis 1994 ergab sich ein Anstieg der jährlichen Erkrankungsrate an Adenokarzinomen für weiße und schwarze Einwohner von über 350%. Dadurch tritt mittlerweile das Adenokarzinom bei Menschen mit weißer Hautfarbe häufiger auf als das Plattenepithelkarzinom (Abbildung 1-6) (Devesa et al., 1998; Moyana und Janoski, 1996). Die Erkrankungen an Plattenepithelkarzinomen dagegen gingen in diesem Zeitraum zurück. Dieser Trend hat sich in vielen weiteren Studien auch für andere westliche Zivilisationen bestätigen lassen (Liabeuf und Faivre, 1997; Hansen et al., 1997; Armstrong und Borman, 1996; Lord et al., 1998).



**Abbildung 1-6: Altersstandardisierter Trend der Inzidenzraten der Ösophaguskrebsarten in den USA (nach Devesa et al., 1998)**

Als Ursache für diese Entwicklung werden mehrere Gründe diskutiert. So zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zur Refluxerkrankung und zum Barrett-Ösophagus, einer Metaplasie intestinaler Zellen der Ösophagusschleimhaut, deren maligne Entartung als Vorstufe zum Adenokarzinom diskutiert wird (Bytzer et al., 1999; O'Connor et al., 1999; Cameron, 2002). Obwohl auch die Adipositas insbesondere bei Männern das Risiko für das Adenokarzinom der Speiseröhre signifikant erhöht, ist noch unklar, ob hier ein unmittelbarer Zusammenhang mit der Refluxkrankheit besteht (Lagergren et al., 1999). Eine weitere wichtige Ursache könnte die Abnahme des massiven Tabak- und Alkoholkonsums sein, die sich in erster Linie auf die Inzidenz der Plattenepithelkarzinome auswirkt. Rauchen und Trinken sind im Gegensatz dazu keine oder nur geringe Risikofaktoren für das Adenokarzinom (Lagergren et al., 2000). Das Risiko an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken steigt um den Faktor 18 bei Aufnahme von mehr als 80 g Alkohol pro Tag und um das 130fache bei zusätzlichem Konsum von mehr als 20 Zigaretten täglich (Blot, 1992; Castellsagué et al., 1999; Zambon et al., 2000). Zusätzlich könnte die längere Latenzzeit des Adenokarzinoms bei zunehmender Lebenserwartung die Ursache für das verzögerte Ansteigen dieser Tumorraten sein (Devesa et al., 1998).

In anderen Studien wurden weitere Ursachen für das Auftreten von Ösophaguskarzinomen untersucht, ohne dabei jedoch die histologische Einstufung der Tumoren zu berücksichtigen. Es zeigten sich Abhängigkeiten der Tumorfrequenz vom Anteil ungesättigter Fettsäuren in



der Nahrung (Tzonou et al., 1996), von Fettleibigkeit (Chow et al., 1998), vom Konsum heißer alkoholischer Getränke (Launoy et al., 1997) oder auch vom Tabakkauen (Nandakumar et al., 1996). Für China wird der Mangel an den Vitaminen A, B und C, aber auch Opiumteer als Mitverursacher diskutiert. Ernährungsfaktoren, wie eine geringe Zufuhr von Früchten und Gemüse, soll eine Verdoppelung des Erkrankungsrisikos bewirken, frühere Autoimmunerkrankungen ein 2,4-faches Risiko. Das Vorliegen von Allergien dagegen soll das Risiko um den Faktor 0,6 reduzieren (Dai et al., 1997).

Auch die Aufnahme von Nitrosaminen und deren Vorstufen werden vielfach als Risikofaktoren diskutiert (Mirvish, 1995). Sie können über die Nahrung (pilzverseuchte Lebensmittel, eingelegtes Gemüse, geräuchertes Fleisch), mit Wasser oder Tabakrauch aufgenommen werden. Nitrosamine können zudem auch endogen durch Reaktion von Nitrit mit sekundären oder tertiären Aminen entstehen. Die höchsten Nitrosaminbelastungen wurden aus China, dem Iran, Südafrika und der Kaschmirregion berichtet, also in Ländern mit besonders hohen Inzidenzraten für Ösophaguskarzinome.

## 1.2 Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Tumoren entstehen durch überschießendes Wachstum körpereigener Zellen, die autonom und progressiv wachsen. Als exogene Ursachen der Tumorentstehung kommen ionisierende Strahlen, onkogene Viren und chemische Kanzerogene in Betracht. Die chemische Kanzerogenese bezeichnet die Entstehung benigner und maligner Tumoren unter Einwirkung von Chemikalien. Bei Kanzerogenen handelt es sich per Definition um Stoffe, die in einem geeigneten Tierversuch

- die Inzidenz spontaner Tumoren erhöhen.
- die Latenzzeit bis zum Auftreten solcher Tumoren verkürzen.
- Tumoren in anderen Geweben erzeugen.
- die Zahl der Tumoren pro Tier erhöhen.

Gutartige Tumoren wachsen verdrängend und bleiben gewöhnlich auf ihren Ursprungsort begrenzt. Maligne Tumoren dagegen sind entdifferenziert und zeichnen sich durch schnelles Wachstum mit hoher Zellteilungsrate aus. Sie infiltrieren in Nachbargewebe, zerstören dieses und sind in der Lage, Metastasen (Absiedelungen) zu bilden.

Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (Abbildung 1-7) veranschaulicht die heute etablierte Theorie zur Tumorentstehung durch chemische Risikofaktoren. Die Mehrheit der Kanzerogene bedarf als Prokanzerogen einer metabolischen Aktivierung, um ihr tumor-erzeugendes Potenzial zu entfalten. Die Wechselwirkung dieses ultimalen Kanzerogens mit DNA, RNA, Proteinen oder anderen Zellbestandteilen führt zu einer bleibenden Veränderung (Initiation). Durch Promotoren ist eine Unterstützung der Effizienz der Kanzerogene möglich. Sie wirken meist proliferationsfördernd, müssen jedoch gleichmäßig über einen längeren Zeitraum aufgenommen werden um wirksam zu sein. Das Risiko einer Krebserkrankung steigt demnach mit steigender Dosis des Kanzerogens und mit längerer Aufnahme von Promotoren. Das Tumorwachstum ist schließlich als klonales Expandieren der transformierten Zelle zu verstehen.

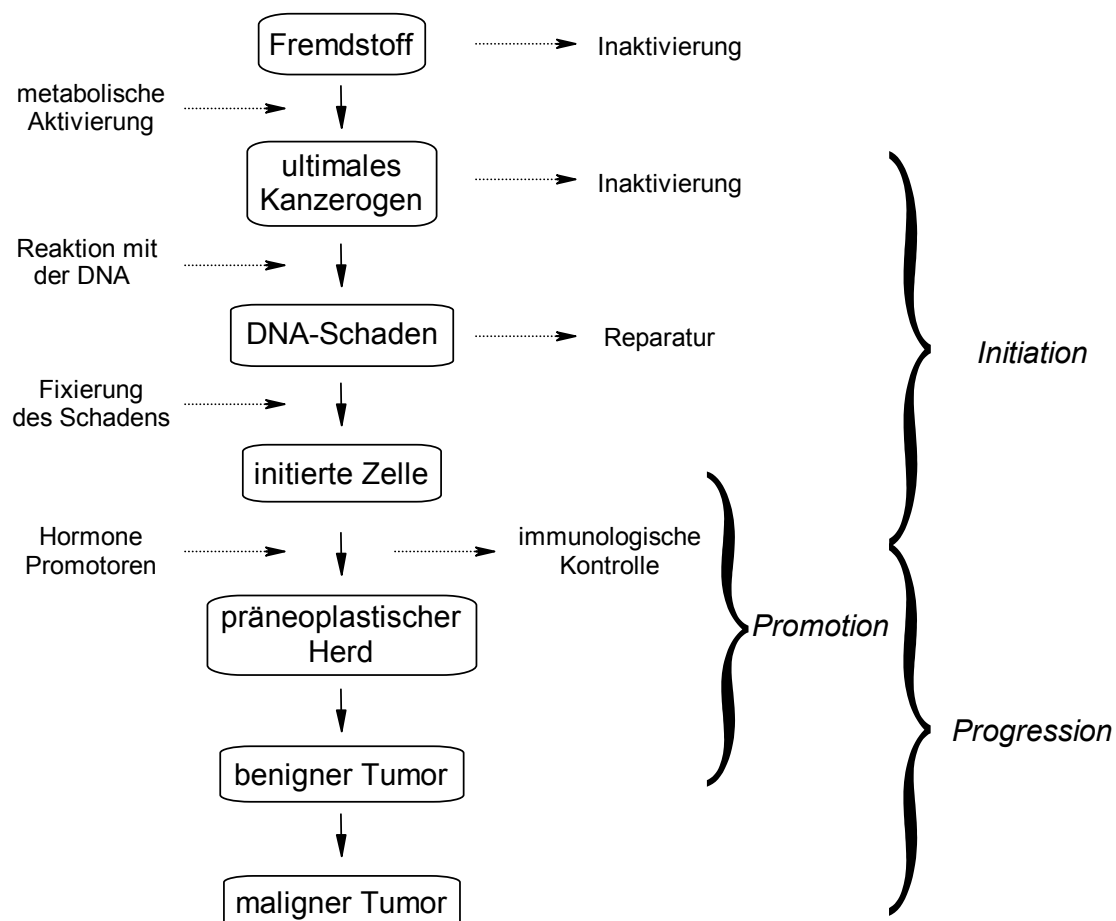


Abbildung 1-7: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (nach Machholz und Lewerenz, 1989)

Der Körper ist einem Angriff von Kanzerogenen jedoch nicht schutzlos ausgeliefert, sondern verfügt über zahlreiche Abwehrmechanismen. Zum einen ist eine Inaktivierung und Ausscheidung des Kanzerogens im Zuge des Fremdstoffmetabolismus möglich, ehe es zur

Reaktion mit Zellbestandteilen kommen kann. Zum anderen kann selbst eine Veränderung des genetischen Materials durch Reparaturmechanismen korrigiert werden.

### **1.3 Ernährung: Ursächliche und chemopräventive Wirkungen in der Kanzerogenese**

Eine gemüse- und fruchtereiche Ernährung hat in diversen Studien eine schützende Wirkung gegen die häufig vorkommenden Epithelialkarzinome gezeigt, darunter vor allem die des Verdauungstraktes, aber auch der Lunge, Brust, Prostata oder der Schilddrüse (Potter, 1996; Potter und Steinmetz, 1996; La Vecchia et al., 1999; La Vecchia et al., 2000). Die geschätzte Aufnahme diverser Antioxidantien mit der Nahrung wie  $\beta$ -Carotin, Vitamin E und Calcium zeigten eine signifikant umgekehrte Korrelation zu Brustkrebs (Levi et al., 1993). Aber auch für den Ösophaguskrebs werden umgekehrte Korrelationen mit Carotinoiden, Vitamin C und E und anderen Mikronährstoffen beschrieben (Franceschi et al., 2000; Negri et al., 2000). Die Versuche, das Auftreten von Lungenkrebs bei Rauchern durch Vitaminsubstitution zu verhindern oder zu verzögern, waren dagegen nicht erfolgreich. Die Einnahme von Vitamin E war ohne protektive Wirkung, die Einnahme von  $\beta$ -Carotin, entweder allein oder in Kombination mit Retinol, hatte dagegen eine verstärkende Wirkung auf Lungenkrebs. Die Studien mussten aus diesem Grund vorzeitig abgebrochen werden (Omenn et al., 1996; Albanes et al., 1996). Ein positiver Zusammenhang mit dem Fleischkonsum konnte bisher am deutlichsten für Kolon-, aber auch für Rektum-, Magen-, Pankreas- und Blasenkarzinome gezeigt werden (Tavani et al., 2000), während der Fischkonsum und der Verzehr von Vollkornprodukten eine protektive Wirkung zeigte (Fernandez et al., 1999; Levi et al., 2000). Auch Rohfasern werden schützende Einflüsse vor allem für Kolon- und Rektalkarzinome zugesprochen. Als Ursache wird die Beschleunigung der Darmpassage oder die Resorption schädlicher Stoffe angeführt, ohne bisher dafür Beweise zu haben (Potter, 1996). Dagegen zeigen aufgearbeitete Getreideprodukte für den Verdauungstrakt, für Brust und Schilddrüse ein erhöhtes Risiko zur Erkrankung an Krebs. Aber auch grundsätzliche Zusammenhänge von Körpergewicht, Insulinresistenz und dem Anteil ungesättigter Fettsäuren an der Nahrung werden für Krebs der Brust (Franceschi et al., 1998), des Kolorektums (Braga et al., 1998), in Mund und Rachenraum (Franceschi et al., 1991) und im Ösophagus (Bosetti et al., 2000) beschrieben.

## 1.4 Chemoprävention

Die Chemoprävention beschreibt allgemein die vorbeugende Gabe chemischer Substanzen in Form von Arzneimitteln oder als Bestandteil der Nahrung, um die Entstehung krankhafter Vorgänge zu verhindern oder abzumildern. Im Falle einer Chemoprävention von Krebs unterscheidet man die Strategien der Blockierung und der Suppression. Während blockierende Substanzen die Initiation einer Tumorzelle verhindern, verzögern supprimierende Stoffe die Promotion und Progression der Tumoren. Neben dem Abfangen von Elektrophilen und der Induktion der DNA-Reparatur spielen vor allem auch Effekte der Hemmung oder Induktion des Cytochrom P450-Systems eine Rolle (Morse und Stoner, 1993). Diskutiert und teilweise nachgewiesen sind hier Effekte von Vitaminen, Spurenelementen und phenolischen Verbindungen. Für die Bildung von Nitrosaminen sind derartige Effekte auch beim Menschen beschrieben (siehe auch Kap. 1.6). So wird für die Ascorbinsäure in mehreren epidemiologischen Studien ein schützender Effekt gegen Magenkrebs beschrieben, wobei als Ursache die reduktiven Eigenschaften vermutet werden (Block, 1991). Die Ascorbinsäure reagiert rasch mit dem nitrosierenden Agens in einer Redoxreaktion unter Bildung von Dehydroascorbinsäure und NO, wodurch eine mögliche Reaktion mit im Magen vorliegenden Aminen verhindert wird (Bartsch et al., 1988).

Unter den Teesorten werden vor allem für den grünen Tee chemopräventive Wirkungen beschrieben. Die Ergebnisse epidemiologischer Studien zur Beziehung von Teekonsum und verschiedenen Krebsarten sind jedoch widersprüchlich (Yang und Wang, 1993; Blot et al., 1996). Einerseits zeigen Studien eine positive Korrelation von Konsum heißen Tees mit Ösophaguskrebs (Craddock, 1992; Craddock, 1993), eine amerikanische Studie dagegen zeigt eine negative Beziehung zur Inzidenz dieser Krebsart (Rogers et al., 1995). Tierversuche wiederum belegen präventive Wirkungen für Lunge, Magen oder auch die Haut (Katiyar und Mukhtar, 1996). Als Ursache für diese Effekte werden die enthaltenen Catechine bzw. Polyphenole diskutiert. *In vivo* und *in vitro* Versuche zeigen eine mit der Konzentration der Stoffe schwankende protektive, aber auch progressive Wirkung auf die Nitrosamin-Bildung (Wu et al., 1993; Vermeer et al., 1999; Wilp et al., 2002a).

Ein direkter Einfluss auf die  $\alpha$ -Hydroxylierung des NNK konnte beispielsweise für die nichtsteroidalen Antiphlogistika Indometacin (Amuno<sup>®</sup>), Piroxicam (Felden<sup>®</sup>), Naproxen (Aleve<sup>®</sup>), Sulindac (Clinoril<sup>®</sup>) und Ibuprofen (Aktren<sup>®</sup>) *in vitro* gezeigt werden (Bouchard und Castonguay, 1993). Durch Acetylsalicylsäure (Aspirin<sup>®</sup>) und einen COX-2-Hemmer konnte bei Mäusen unter NNK-Fütterung eine deutliche Reduktion von Lungentumoren

erreicht werden (Rioux und Castonguay, 1998). Während wiederum sowohl positive als auch negative Einflüsse von Chlorophyll auf die Mutagenität von NNK beschrieben werden (Romert et al., 1992), konnte unter Einwirkung von 3-Phenylpropylisothiocyanat (PPITC) das verminderte Auftreten von Ösophaguskarzinomen bei Ratten eindeutig nachgewiesen werden (Stoner et al., 1998). In die Reihe dieser als Inhibitoren für die Tumorigenese bei Ratte und Maus beschriebenen Substanzen sind weiterhin Coffein (Xu et al., 1992), Limonen- und Orangenöl (Wattenberg und Coccia, 1991), myo-Inositol und Dexamethason (Wattenberg und Estensen, 1996) einzugliedern. In einer weiteren Arbeit konnten aktivierende Einflüsse auf NNK unter chronischem Alkoholkonsum und ausgiebiger Bewegung bei Mäusen gezeigt werden (Ardies et al., 1996).

## 1.5 Tabak und Tabakrauch

Beim Rauchen von Zigaretten, Zigarren und Pfeifentabak unterscheidet man zwischen dem Hauptstromrauch (HS) und dem Nebenstromrauch (NS) (Abbildung 1-8).

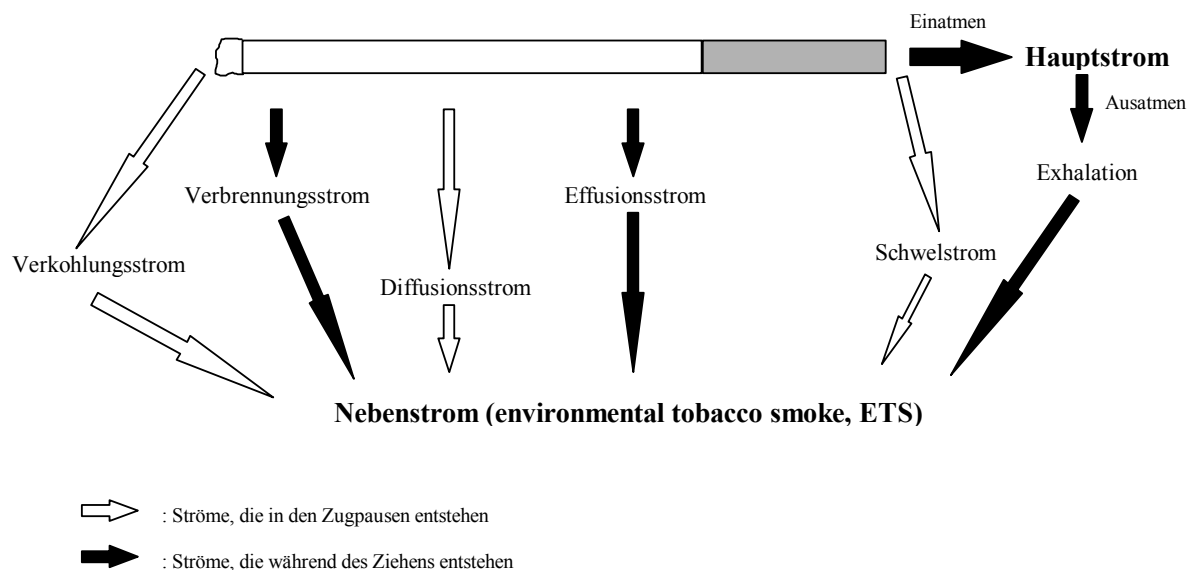


Abbildung 1-8: Rauchströme beim Rauchen einer Zigarette (Lipp, 1965; Römpf Chemie Lexikon, 1995)

Der Hauptstromrauch entsteht unter Verbrennung bei 700 bis 900°C in der Glimmzone der Zigarette unter Einwirkung großer Mengen Sauerstoff durch den Zug des Rauchers und wird von diesem größtenteils inhaliert. Der Nebenstromrauch wird im gleichen Bereich unter geringerer Hitze (400 bis 600°C) und in Sauerstoffarmut während der Zugpause gebildet. Er passiert nur in geringen Mengen den Filter der Zigarette. Aus den unterschiedlichen Bedin-

gungen während der Verbrennung resultieren zwei sehr unterschiedliche Stoffgemische. Man unterscheidet die gasförmige Phase und die Partikelphase. Bereits in den 30er Jahren gab es erste Hinweise auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Tabakrauchs. Ein Vergleich der pH-Werte von HS und NS ergab einen schwach sauren pH des HS und einen schwach alkalischen Wert für NS (Wenusch, 1930).

Die Gasphase des HS von Zigaretten macht 90-96% des Gesamtgewichts aus. Sie besteht hauptsächlich aus Stickstoff (56-64%), Sauerstoff (11-14%), Kohlendioxid (9-13%) und Kohlenmonoxid (2,8-4,2%). Darin befinden sich auch als toxikologisch wichtigste Verbindungen Kohlenmonoxid, Ammoniak, Stickstoffoxide, Blausäure, Formaldehyd, Acetaldehyd, 1,3-Butadien, Benzol, Pyridin, Vinylchlorid, Acrolein und flüchtige Nitrosamine. In der Partikelphase, dem „Teer“, befinden sich die halb- und nichtflüchtigen Stoffe, beispielsweise *Nicotiana*-Alkaloide, aromatische Amine oder polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK). Man schätzt die Gesamtzahl der vorhandenen Verbindungen auf bis zu 12 000, wobei bisher circa 4 800 Verbindungen isoliert und identifiziert wurden (Richter und Scherer, 2004; Hoffmann und Hoffmann, 1997). Darunter befinden sich organspezifische Kanzerogene, Cokanzerogene, sowie Promotoren und Inhibitoren der Tumorigenese (Hoffmann und Hecht, 1990; Anon, 1986). Einige der wichtigsten Kanzerogene im HS und NS sind in Tabelle 1-2 dargestellt.

**Tabelle 1-2: Kanzerogene in HS und NS von Zigaretten (nach Richter und Scherer, 2004)**

Substanz	NS µg/Zigarette	NS/HS	mögliche Zielorgane <sup>2</sup>
Benzol	240-490	8-10	<b>Knochenmark, Leukämie</b>
Formaldehyd	1500	50	Nase
Teer (Gesamtpartikel)	14-30 mg	1-16	
Benzo[a]pyren	0,04-0,07	2,5-20	Lunge, Kehlkopf
N-Nitrosodimethylamin	0,2-1,0	20-130	Leber, (Niere)
4-Aminobiphenyl	0,14	31	<b>Harnblase</b>
N'-Nitrosonornikotin	0,15-1,7	0,5-5,0	Ösophagus, Mundhöhle
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) <sup>1</sup>	0,2-1,4	1-22	Lunge, Kehlkopf, Pankreas, Leber

<sup>1</sup>NNK = nicotine derived nitrosamino ketone

<sup>2</sup>fett gedruckte Zielorgane sind für den Menschen sicher nachgewiesen

Der environmental tobacco smoke (ETS), also der Tabakrauch in der Raumluft, welcher sich zu 85% aus NS und zu 15% aus exhalierem HS zusammensetzt, belastet nicht nur den Passivraucher, sondern auch den Raucher selbst. Obwohl der NS die Kanzerogene in Folge der unvollständigeren Verbrennung in bis zu 130-facher Konzentration des HS enthält, ist die Aufnahme gefährlicher Stoffe durch die schnelle Verdünnung mit der Raumluft und durch Alterungsprozesse deutlich geringer als beim Raucher. Die Beurteilung des Gefahrenpotenzials des ETS ist schwierig und wird kontrovers geführt (Anon, 1997; Marquardt, 1996; Richter, 1996b; Witschi et al., 1997). So existieren Studien, die zu dem Ergebnis kommen, dass Passivrauchexposition in der Kindheit das Lungenkrebsrisiko geringfügig aber signifikant senkt wogegen die Exposition im Erwachsenenalter mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko einhergeht (Bofetta et al., 1998). Auch in den ländlichen Gebieten Chinas soll Passivrauchbelastung in der Kindheit zu einem signifikant erhöhten Lungenkrebsrisiko führen (Wang et al., 2000). Der Zusammenhang zwischen der Exposition des Menschen mit ETS und einer gehäuften Wahrscheinlichkeit an Lungenkrebs zu erkranken wurde noch in zahlreichen weiteren Studien untersucht. Wenn auch die Mehrzahl der Studien ein geringfügig erhöhtes Risiko für Nichtraucher ergeben hat, so lässt sich der Zusammenhang statistisch nicht sicher beweisen (Nilsson, 1996). Daher sollte die ETS-Belastung nur als ein Faktor neben der Ernährung und allgemeinen Lebensgewohnheiten für die Aufnahme genotoxischer Substanzen, wie Benzol, PAK, aromatischer Amine und den TSNA verstanden werden (Scherer und Richter, 1997). Das größte kanzerogene Potenzial im Tabakrauch wird den Substanzgruppen der PAK, der aromatischen Amine und den TSNA zugeschrieben.

### **1.5.1     *Tabakalkaloide***

Alkaloide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Als Funktionen werden ihnen im allgemeinen der Fraß- bzw. Insektenschutz, osmotische Inaktivierung und Entgiftung nachgesagt (Bush et al., 1993). Einige der wichtigsten Alkaloide der Tabakpflanze (*Nicotiana ssp.*) sind Nikotin, Nornikotin, Anabasin und Anatabin (Abbildung 1-9). Es sind hauptsächlich die Pflanzenart, die Anbauweise, der Reifungsgrad und der Einsatz von Düngemitteln, die die Menge an vorhandenen Alkaloiden in *Nicotiana*-Pflanzen bestimmen. Jeder Schritt des Tabakanbaus, der sich auf den Pflanzenmetabolismus auswirkt, kann in bestimmten Grenzen die Menge an gebildeten Alkaloiden beeinflussen. Während Tabakblätter den höchsten Gehalt an Nikotin besitzen, verfügen die Wurzeln bereits über weniger, der Stengel hingegen weist den geringsten Anteil auf. Der Gehalt an Alkaloiden steigt insbesondere während des

Reifungsprozesses an. Nach Ernte und Fermentation enthält der Rohtabak je nach Sorte 5 bis 180 mg/g Nikotin. Die Gehalte für Nornikotin und Anatabin belaufen sich auf durchschnittlich 2 mg/g bzw. 1 mg/g (Franke, 1992; Rundlöf et al., 2000).

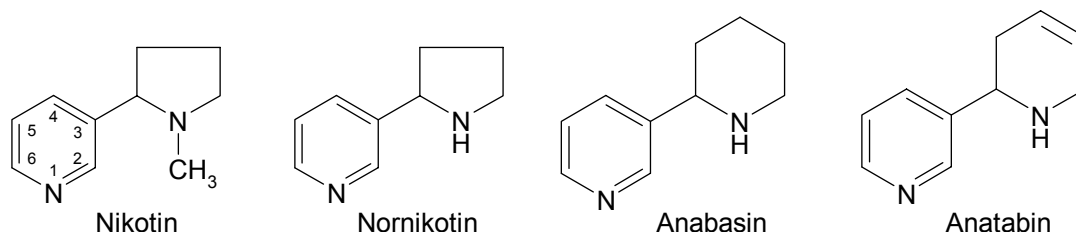


Abbildung 1-9: Strukturen einiger Tabakalkaloide

### 1.5.2 Biosynthese von Tabakalkaloiden

Die Vorstufen für die Pyridin-, Pyrrolidin- bzw. Piperidin-Ringe von Nikotin, Nornikotin, Anatabin, Anabasin und Myosmin konnten bestimmt und entsprechende Schemata ihrer Biosynthese entwickelt werden. Allerdings war es bislang nicht möglich alle Zwischenstufen im Syntheseprozess zu identifizieren, ebenso konnten viele an der Synthese beteiligten Enzyme noch nicht vollständig charakterisiert werden.

Der Pyridin-Ring von Nikotin, Nornikotin, Anabasin und Anatabin stammt aus der Nikotinsäure. Als Vorstufe konnte Chinolinsäure identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Kohlenstoffatome des Glycerinaldehyd-3-phosphats ausnahmslos in den Positionen C-4, C-5 und C-6 des Pyridinrings der Chinolinsäure wiederfinden (Yang et al., 1965). Bei der Gabe von 3-<sup>14</sup>C-Aspartat und 3-<sup>14</sup>C-Malat an *Nicotiana rustica* konnte ein Einbau der markierten Kohlenstoffatome fast ausschließlich an der C-2 bzw. C-3 Position des Pyridinrings festgestellt werden (Jackanicz und Byerrum, 1966).

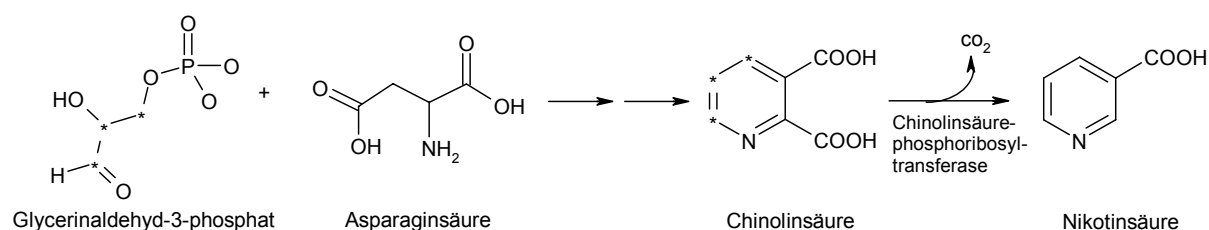
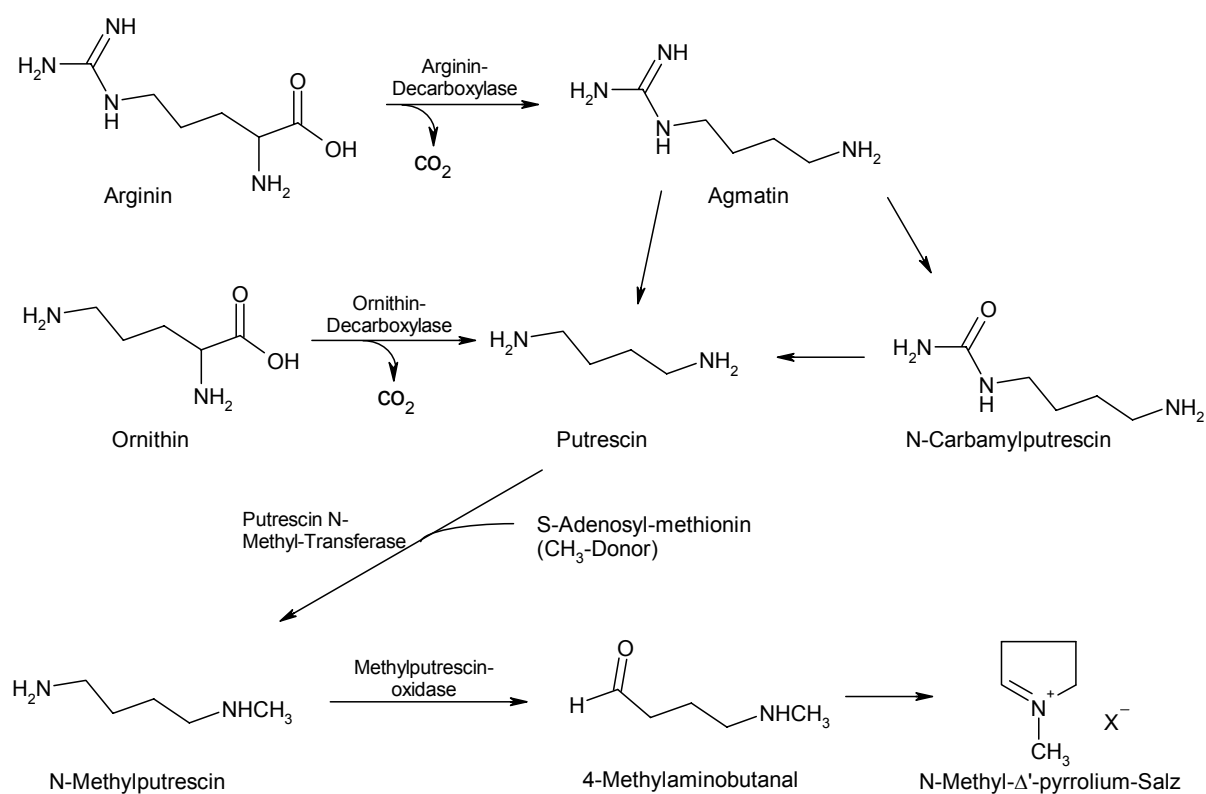


Abbildung 1-10: Biosynthese der Nikotinsäure



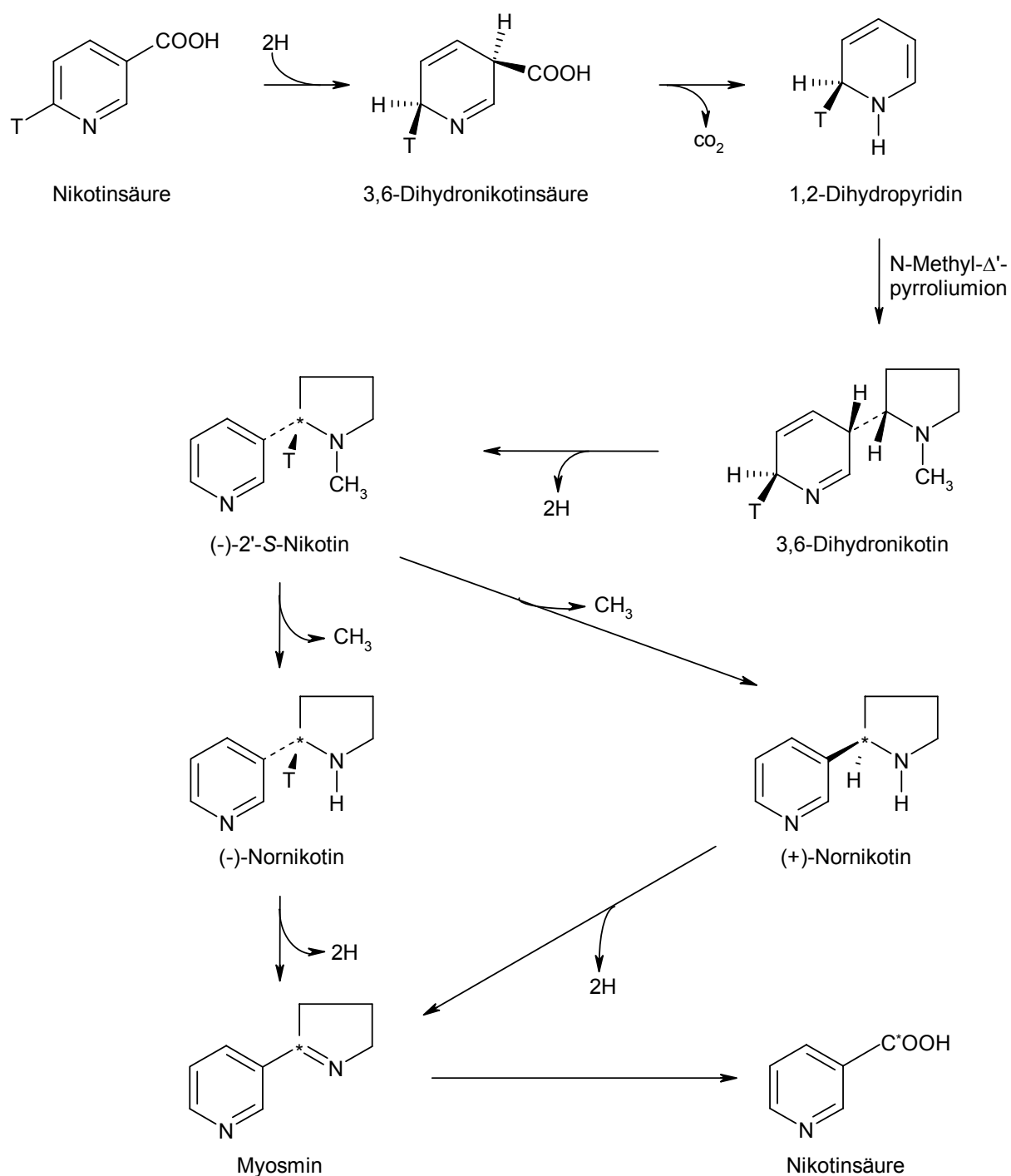
Der Hauptsyntheseweg für den *N*-Methylpyrrolidinring von Nikotin führt über das Putrescin, *N*-Methylputrescin und 4-Methylaminobutanal zum *N*-Methyl- $\Delta'$ -pyrrolinium - Salz (Abbildung 1-11, Dewey et al., 1955; Leete, 1955). Als Vorstufen von Putrescin wurden Arginin, Agmatin und *N*-Carbamylputrescin identifiziert (Yoshida und Mitake, 1966; Yoshida, 1969a; Yoshida, 1969b).



**Abbildung 1-11: Biosynthese des *N*-Methyl- $\Delta'$ -pyrrolinium-Salzes**

Die Reaktionsschritte ausgehend von der Nikotinsäure bis hin zum Nikotin konnten ebenfalls nachvollzogen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Nikotinsäure auf dem Weg zum Pyridinring des Nikotins ihre Carboxyl-Gruppe verliert (Dawson et al., 1960a; Dawson et al., 1960b). Weitere Forschungen führten zu der Hypothese, dass ein Reaktionsschritt die Reduktion von Nikotinsäure zu 3,6-Dihydronikotinsäure darstellt (Dawson et al., 1960a; Dawson und Osdone, 1972; Leete, 1977). In den 90er Jahren wurde vorgeschlagen, dass die 3,6-Dihydronikotinsäure mittels Protonenwanderung nach anschließender Decarboxylierung das 1,2-Dihydropyridin liefert (Friesen und Leete, 1990). Dieses reagiert mit dem *N*-Methyl- $\Delta'$ -pyrrolinium-Salz zu 3,6-Dihydronicotin. Die folgende Oxidation, bei der das Wasserstoffatom, welches ursprünglich an der C-6-Position der Nikotinsäure gebunden war, abgespalten wird und bei der eine Retention des Wasserstoffatoms, das im Reduktionsschritt

zu 3,6-Dihydronikotinsäure eingeführt wurde, stattfindet, liefert schließlich (-)-2'-*S*-Nikotin (Abbildung 1-12). Alles in den Tabakpflanzen vorhandene Nikotin ist (-)-2'-*S*-Nikotin.



**Abbildung 1-12: Bildung von (-)-2'-*S*-Nikotin, Nornikotin und Myosmin aus Nikotinsäure und *N*-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolidium-Salz (unter Verwendung Tritium-markierter Verbindungen)**

Nornikotin scheint irreversibel aus Nikotin in den grünen Blättern bzw. während der Alterung zu entstehen (Dawson, 1951). Die Demethylierung von (-)-2'-*S*-Nikotin im Tabak liefert (-)-

2'-*S*-Nornikotin und (+)-2'-*R*-Nornikotin in annähernd identischen Mengen (Abbildung 1-12). Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus zeigen ein Iminium-Salz als Zwischenstufe und eine Tautomerisierung, welche die beobachtete Racemisierung des Nornikotin erklären (Leete und Chedekel, 1974). Die *N*-Demethylierung von Nikotin ist ein wichtiger Schritt im Alkaloid-Metabolismus vieler *Nicotiana*-Species, da es der letzte Reaktionsschritt bei der Synthese von Nornikotin ist. Die Charakterisierung des beteiligten Enzyms könnte Eingriffsmöglichkeiten in die Bildung und Akkumulation von *N'*-Nitrosornikotin (NNN) und *N'*-Acylnornikotin in Tabakpflanzen eröffnen.

Myosmin entsteht in der heranwachsenden Pflanze durch Dehydrogenierung von Nornikotin (Kisaki und Tamaki, 1966; Leete und Chedekel, 1972). Nach Gabe von  $^{14}\text{C}$ -Nornikotin an intakte Tabakpflanzen über den Zeitraum von acht Tagen wurden 55% der Radioaktivität in Nornikotin und 15% in Myosmin wiedergefunden. Gibt man den *Nicotiana glauca*-Pflanzen 2'- $^{14}\text{C}$ -Myosmin, so findet man kein markiertes Nikotin bzw. Nornikotin, was darauf hindeutet, dass die Bildung von Myosmin irreversibel vonstatten geht. Jedoch wurde Radioaktivität bei der Nikotinsäure beobachtet, wobei der Großteil der markierten Kohlenstoffatome in der Carboxyl-Gruppe gebunden ist (Abbildung 1-12; Leete, 1984).

## 1.6 Nitrosamine

Nitrosamine entstehen bevorzugt im sauren Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure (Abbildung 1-13). Die Reaktion verläuft mit sekundären Aminen im Allgemeinen schneller als mit tertiären, da bei diesen zunächst eine Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung gespalten werden muss (Williams, 1988). Halogenide und Pseudohalogenide ( $\text{X}^-$ ) beschleunigen die *N*-Nitrosierung durch Bildung von NOX, welches reaktiver ist als  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Die Reihenfolge ihrer katalytischen Aktivität ist:  $\text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ . Thiocyanationen sind unter anderem Bestandteil des Speichels. Unter Einwirkung von Stickoxiden nitrosieren primäre und sekundäre Amine wiederum unabhängig von der Basizität des Amins (Machholz und Lewerenz, 1989). Die eigentliche Reaktion erfolgt dabei über das Nitrosylkation oder Nitrosylhalogenide. Durch das pH-Milieu des Reaktionsmediums lässt sich die Ausbeute über den Anteil des aktiven Nitrosierungsagens steuern. Das Ausbeuteoptimum befindet sich im Bereich eines pH-Werts von 3,0 bis 3,5. Ein niedrigerer pH-Wert würde zu einer Protonierung des Stickstoffs des sekundären Amins zum Iminiumion führen und eine Reaktion mit nitrosierenden Substanzen behindern. pH-Werte jenseits von 5 hingegen unterbinden weitgehend die säurekatalysierte Nitrosierung.

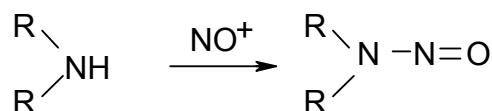


Abbildung 1-13: Vereinfachtes Nitrosierungsschema

### 1.6.1 Gefahrenpotenzial der Nitrosamine

Seit der Entdeckung der kanzerogenen Eigenschaften des *N*-Nitrosodimethylamins (Magee und Barnes, 1956) wurde in zahlreichen Tierversuchen belegt, dass fast alle Nitrosamine kanzerogen sind. 90% der bisher über 300 untersuchten Nitrosamine erweisen sich als krebserregend, wobei sie sich durch große Unterschiede in der Stärke ihrer kanzerogenen Wirkung auszeichnen. Bei Nagern induzieren sie überwiegend Tumoren in Leber, Ösophagus, Nasen- und Mundschleimhaut, Niere, Pankreas, Harnblase, Lunge und Schilddrüse (Koehl und Eisenbrand, 1999).

Um ihr kanzerogenes Potenzial entfalten zu können, bedürfen alle Nitrosamine einer metabolischen Aktivierung. Diese erfolgt meist über eine Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP) vermittelte  $\alpha$ -Hydroxylierung (Abbildung 1-14). Deutliche Unterschiede bezüglich der metabolischen Aktivierung der einzelnen Nitrosamine zeigt die große Gruppe der Cytochrom P450 Isoenzyme. Häufig existiert für ein bestimmtes Nitrosamin ein Isoenzym mit besonders hoher Affinität und einige mit wesentlich geringerer Umsatzrate. Die gewebespezifische Aktivität der CYP Isoenzyme kann zum Teil die unterschiedlichen Organspezifitäten der Nitrosamine bei der Tumorbildung erklären, die unabhängig von der Applikationsart auftreten (Mirvish, 1995).

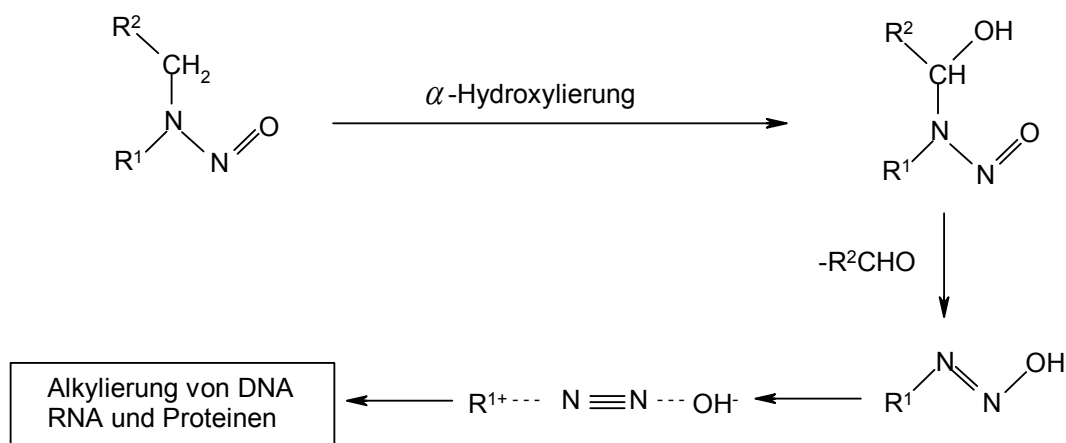


Abbildung 1-14: Mechanismus der Adduktbildung durch Nitrosamine

Die  $\alpha$ -Hydroxylierung führt zu einem instabilen  $\alpha$ -Hydroxynitrosamin, das unter Protonenwanderung und Abspaltung eines Aldehyds zum Diazohydroxid reagiert. Dieses ultimale Kanzerogen kann unter Stickstoff-Abspaltung DNA, RNA und Proteine alkylieren oder nach Hydrolyse entsprechende Alkohole bilden.

Die Relevanz der  $\alpha$ -Hydroxylierung für die metabolische Aktivierung und die daraus resultierende kanzerogene Wirkung wird besonders deutlich, wenn man Nitrosamine mit sterisch gehindertem  $\alpha$ -C-Atom betrachtet. Während eine Methyl-Substitution in  $\alpha$ -C-Position bereits eine verringerte Kanzerogenität bewirkt, ist die sterische Hinderung durch eine tert-Butylgruppe wie bei *N*-Nitroso-*N*-methyl-tert-butylamin so stark, dass keine Aktivierung mehr stattfinden kann und das Nitrosamin folglich nicht kanzerogen wirkt (Koehl und Eisenbrand, 1999).

Die akute Toxizität der Nitrosamine variiert stark und korreliert nicht mit der kanzerogenen Potenz. Mit einem LD<sub>50</sub> Wert von 18 ng/kg Körpergewicht für die Ratte ist *N*-Nitroso-*N*-methylbenzylamin das am stärksten toxische Nitrosamin. Im Gegensatz dazu beträgt der LD<sub>50</sub> Wert für das starke Leberkarzinogen *N*-Nitrosodiethylamin 7500 mg/kg KG.

### 1.6.2 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen

Die Nitrosaminbelastung des Menschen setzt sich aus diversen Faktoren zusammen. Auf der einen Seite werden vom menschlichen und tierischen Körper in allen Bereichen des täglichen Lebens Nitrosamine genauso wie andere Giftstoffe aufgenommen, zum anderen besteht im Organismus selbst die Möglichkeit der **endogenen Nitrosierung** von Substanzen.

Es ist prinzipiell davon auszugehen, dass Amine im menschlichen Organismus durch endogene Nitrosierung dieselben Nitrosamine bilden, die sich auch *in vitro* durch klassische Nitrosierungsmechanismen darstellen lassen. Eine chemische Nitrosierung findet beispielsweise im sauren pH-Milieu des Magens statt, wenn Amine als nitrosierbare Verbindungen und Nitrit oder Stickoxide vorhanden sind. Der Nitritgehalt im Magen lässt sich hauptsächlich auf Nitrat zurückführen, welches mit der Nahrung aufgenommen wurde. Dieses wird vom Gastrointestinaltrakt resorbiert und zu 25% mit Hilfe eines Anionentransportsystems in den Speichel abgesondert (Spiegelhalder et al., 1976; Pannala et al., 2003; Tannenbaum et al., 1976; Anon, 1981). Eine bakterienvermittelte Nitrosierung findet zum Beispiel über die Bakterien der Mundhöhle statt, die mehr als 20% des Speichelnitrats, also 5% der aufgenommenen Menge, zu Nitrit reduzieren. Dieses wird nahezu komplett mit dem Speichel geschluckt und stellt so die

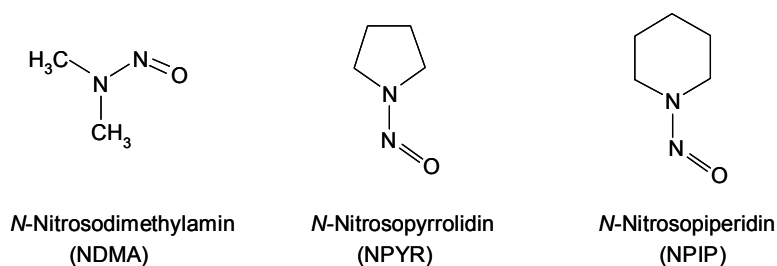
Hauptquelle (80%) für Nitrit im Magen dar (Eisenbrand, 1981; Anon, 1981). Eine nicht unerhebliche exogene Nitritquelle besteht in der Aufnahme von gepökeltem Fleisch oder Fisch. Die durchschnittliche Nitritkonzentration eines nüchternen Menschen liegt im Magensaft bei pH-Werten kleiner als 5 im Bereich von 0,1 bis 2,6  $\mu\text{M}$  und erreicht bei pH-Werten größer 5 Konzentrationen von 26 bis 54  $\mu\text{M}$  (Xu und Reed, 1993). Dieses Nitrit wird allerdings beim gesunden Probanden durch aktive Sekretion von Ascorbinsäure über Redoxreaktionen ständig abgebaut (Iijima et al., 2002; Moriya et al., 2002). Ein hoher pH-Wert des Magensaftes deutet auf einen achlorhydrischen Magen hin, welcher optimale Bedingungen für das Wachstum von Darmbakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus spp.* bietet. Diese Bakterien sind in der Lage, größere Mengen Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Sie katalysieren unter Mitwirkung eines molybdänhaltigen Enzyms die Synthese von Nitrosaminen (Walters et al., 1978; Koehl und Eisenbrand, 1999).

Ebenso kann ein Entzündungsgeschehen für die endogene Bildung von Nitrosaminen verantwortlich sein. Entzündungszellen in Organen mit chronischer Infektion oder Entzündung können Stickoxide bilden. Im Rahmen der Immunstimulation werden diese durch Makrophagen und Neutrophile induziert. Unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthetase wird in einer Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion der endständige Guanidino-Stickstoff des L-Arginins zu Citrullin oxidiert und dabei NO freigesetzt. Dieses dient als Vasodilator in den Arteriolen und als Neurotransmitter. Da es jedoch in großem Überschuss produziert wird, reagiert der überwiegende Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagenzien  $\text{N}_2\text{O}_3$  und  $\text{N}_2\text{O}_4$  (Mirvish, 1995; Vermeer et al., 1999; Vermeer, 2000).

Eine Blasen- oder Harnwegsinfektion durch bestimmte Bakterien, die ihrerseits ein gravierendes Nitrosierungspotenzial besitzen, kann zu einer zusätzlichen Nitrosaminexposition führen (Tricker, 1996).

Die bedeutendsten Quellen für die **exogene Nitrosaminbelastung** stellen nach dem Rauchen, Tabakschnupfen und -kauen die Nahrungsmittel und die berufsbedingte Exposition dar. In Nahrungsmitteln stellt das starke Kanzerogen *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) den größten Anteil, außerdem sind *N*-Nitrosopiperidin und *N*-Nitrosopyrrolidin von Bedeutung. Neben diesen flüchtigen Nitrosaminen (volatile Nitrosamine, VNA) finden sich ferner auch wenig bis nicht kanzerogene, nichtflüchtige Nitrosamine (nichtvolatile Nitrosamine, NVNA), beispielsweise *N*-Nitrososarcosin (NSAR), *N*-Nitrosoprolin (NPRO) und *N*-Nitrosothiazolidin-carbonsäure (NTCA) in Lebensmitteln (Abbildung 1-15).

### Flüchtige Nitrosamine in Nahrungsmitteln



### Nichtflüchtige Nitrosamine in Nahrungsmitteln

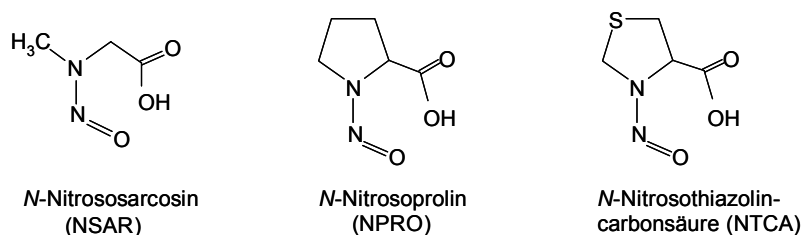


Abbildung 1-15 Flüchtige und nichtflüchtige Nitrosamine in Nahrungsmitteln

Neueren Untersuchungen zufolge nehmen Menschen in Westeuropa pro Person und Tag durchschnittlich 0,5 µg Nitrosamine zu sich (Koehl und Eisenbrand, 1999). In diesem Zusammenhang spielt das Pökeln von Fleisch und Fisch, also die Behandlung mit Natriumnitrit, welche eine längere Haltbarkeit und Ansehnlichkeit der Waren zur Folge hat, eine große Rolle. Um die Belastung der Bevölkerung mit Nitrosaminen zu verringern, ist laut der Fleischverordnung in der Bundesrepublik Deutschland maximal ein Zusatz von KNO<sub>2</sub> und NaNO<sub>2</sub> in einer Menge von 0,05% der Fleischmasse gestattet (Auterhoff et al., 1991).

Die berufsbedingte Exposition mit Nitrosaminen stellte bei der Gummiherstellung, Metallarbeiten und in der Lederproduktion ein Problem dar. Bei der Untersuchung eines deutschen Betriebs zur Gummiherstellung ergaben sich zeitgewichtete Durchschnittskonzentrationen von 30-120 ng/m<sup>3</sup> *N*-Nitrosodimethylamin und 29-78 ng/m<sup>3</sup> *N*-Nitrosodibenzylamin (Dietrich et al., 1996). In der Metallindustrie waren Schneideflüssigkeiten aus gelösten sekundären und tertiären Alkanolaminen mit Nitriten als Korrosionsschutz gängig, die 200-30 000 ng/kg *N*-Nitrosodiethanolamin (Fan et al., 1977) und bis zu 30 000 ng/kg *N*-Nitroso-5-methyl-1,3-oxazolidin (Stephany et al., 1978) enthielten. Diese wurden mittlerweile durch alternative synthetische, weitgehend nitritfreie Flüssigkeiten ersetzt, so dass der Gehalt an *N*-Nitrosodiethanolamin auf durchschnittlich 40,8 ng/m<sup>3</sup> Luft gesenkt werden konnte (Fadlallah et al., 1996).

Nach Einführung von maximal zulässigen Konzentrationen von Gefahrstoffen am Arbeitsplatz in Deutschland darf beispielsweise der strenge gesetzliche Grenzwert von  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , bzw. in besonderen Ausnahmefällen  $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  nicht überschritten werden. Damit verbundene regelmäßige Kontrollmessungen der Raumluft haben zu einer deutlichen Reduzierung der Belastung mit flüchtigen Nitrosaminen in den Produktionsstätten geführt.

Kosmetische Produkte waren in den 1970er Jahren oftmals mit flüchtigen Nitrosaminen, wie NDMA und *N*-Nitrosomorpholin (Spiegelhalder und Preussmann, 1984), sowie mit langkettigen *N*-Nitroso-*N*-methylalkylaminen, zum Beispiel *N*-Nitroso-*N*-methyldodecylamin und *N*-Nitroso-*N*-methyltetradecylamin kontaminiert (Hecht et al., 1982). Inzwischen sind die meisten Kosmetika in Europa frei von den erwähnten Nitrosaminen (Kamp und Eisenbrand, 1991). Nachdem das Gesundheitsrisiko nachhaltig bewiesen wurde, arbeitet man stetig an der Reduktion der Nitrosaminbelastung durch geänderte Rezepturen, sowie Beimischung von Antioxidantien und Komplexbildnern für Iminiumionen (Challis et al., 1995).

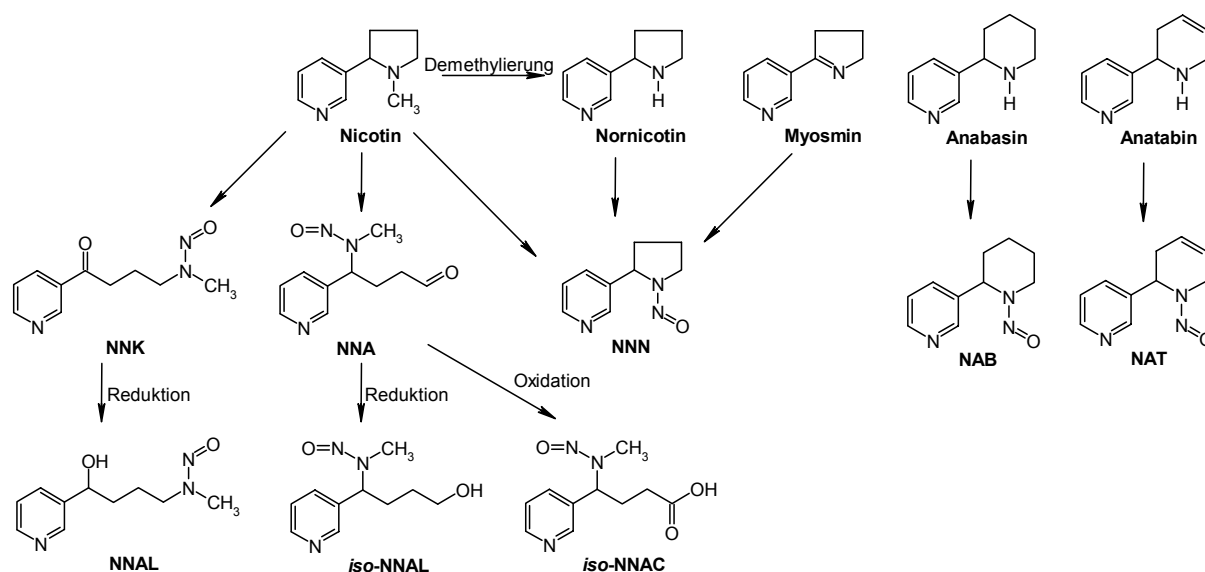
Auch pharmazeutische Produkte enthielten vor circa 30 Jahren bisweilen flüchtige Nitrosamine, wie *N*-Nitrosodiethylamin (Krull et al., 1979). Neuere Studien belegen, dass mittlerweile Arzneimittel als Quelle für eine exogene Nitrosaminbelastung weitgehend ausgeschlossen werden können (Dawson und Lawrence, 1987b; Dawson und Lawrence, 1987a).

In Städten mit hoher Luftverschmutzung ließen sich Nitrosamine sowohl in Deutschland ( $10\text{--}90 \text{ ng}/\text{m}^3$ ; Akkan et al., 1991), als auch in Österreich ( $10\text{--}40 \text{ ng}/\text{m}^3$ ; Spiegelhalder und Preussmann, 1987) und in der früheren Sowjetunion ( $50\text{--}600 \text{ ng}/\text{m}^3$ ; Khesina et al., 1996) nachweisen. Untersuchungen in Südchina ergaben signifikant höhere Aufnahmemengen ( $5,84 \mu\text{mol}/\text{d}$ ) an flüchtigen Nitrosaminen in Gebieten mit einem hohen Risiko an Ösophagustumoren zu erkranken gegenüber Gebieten mit geringerem Risiko ( $3,18 \mu\text{mol}/\text{d}$ , Lin et al., 2002).

### 1.6.3 Tabakspezifische Nitrosamine (TSNA)

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind sieben tabakspezifische Nitrosamine, die durch die Nitrosierung der Tabakalkaloide entstehen, im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert worden. Dazu werden *N*'-Nitrosornikotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), *N*'-Nitrosoanatabin (NAT), *N*'-Nitrosoanabasin (NAB), 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol (*iso*-NNAL) und 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butansäure (*iso*-NNAC) gerechnet (Abbildung 1-16).





**Abbildung 1-16: Bildung der TSNA (in Abwandlung nach Hoffmann et al., 1994)**

Die grünen, jungen Blätter der Tabakpflanze enthalten geringe Spuren an Nitrosaminen, der maßgebliche Teil jedoch entsteht beim Trocknen und Fermentieren der Blätter, sowie während der Alterung des Tabaks (Andersen et al., 1989; Djordjevic et al., 1989b). Der Nikotingehalt der Tabakblätter beträgt circa 1% bis 8%, selten bis zu 15%. Der Anteil an Nitrosaminen im Tabak liegt etwa um den Faktor 3 000 bis 300 000 darunter.

NNN entsteht hauptsächlich durch die Nitrosierung von Nornikotin, in geringerem Ausmaß durch Nitrosierung von Nikotin-*N*-oxid (Klimisch und Stadler, 1976; Mirvish, 1975). Neuesten Untersuchungen zufolge kann auch Myosmin sehr effektiv zu NNN nitrosiert werden (Zwickenpflug, 2000). Den Hauptentstehungsweg von NNK bildet vermutlich der mikrobielle Abbau von Nikotin-*N*-oxid zu Pseudooxynikotin, welches schnell und irreversibel zu NNK nitrosiert wird (Caldwell et al., 1993). Die enzymatische Reduktion der Ketogruppe bei NNK führt zu dem weiteren Nitrosamin NNAL. NAT und NAB entstehen analog zu NNN durch direkte Nitrosierung der Tabakalkaloide Anatabin und Anabasin.

Von allen tabakspezifischen Nitrosaminen konnte NNA als einziges bisher nicht im Tabak bzw. Tabakrauch identifiziert werden. Wegen der hohen Reaktivität der Aldehydgruppe geht man von einer raschen Weiterreaktion zu *iso*-NNAC und *iso*-NNAL aus (Hoffmann et al., 1994).

Der Gehalt an Nitrosaminen ist abhängig von der Alkaloid- und Nitratkonzentration in den Tabakblättern, sowie von den Prozessbedingungen der einzelnen Herstellungsschritte (Tso, 1990; Brunnemann und Hoffmann, 1991). Auch die gewählten Bedingungen bei der Fermen-

tierung fallen ins Gewicht. Daher finden sich beispielsweise besonders hohe Nitrosamingehalte im Schnupftabak (Hecht und Hoffmann, 1989). In den 70er und 80er Jahren wurde vermutet, dass auch bei der Pyrolyse, also während des Rauchens, TSNA entstehen (Hoffmann et al., 1977; Adams et al., 1983), was mittlerweile widerlegt werden konnte (Fischer et al., 1990). Der überwiegende Teil der TSNA im HS stammt von bereits im Tabak enthaltenen TSNA. Einen Vergleich des Gehalts an toxikologisch relevanten Substanzen im HS von Filterzigaretten unterschiedlichen Teergehalts zu filterlosen Zigaretten liefert Tabelle 1-3.

**Tabelle 1-3: Toxische Substanzen im Hauptstromrauch von Filterzigaretten unterschiedlichen Teergehalts und filterlosen Zigaretten (modifiziert nach Smith et al., 2001)**

Verbindung	Repräsentativer Bereich für den US Markt <sup>a</sup>			FF ohne Filter <sup>b</sup>
	FF	FFLT	ULT	
NNN (ng/Zig.)	93-191	53-142	18-96	200-3000
NNK (ng/Zig.)	99-212	62-115	13-83	80-770
NAT (ng/Zig.)	108-235	73-159	25-110	k. A.
Teer (mg/Zig.)	12,9-17,2	8,1-11,6	0,7-7,2	15-40 (TPM)
Nikotin (mg/Zig.)	0,79-1,39	0,60-0,94	0,11-0,59	1,0-2,3
Benzo[a]pyren (ng/Zig.)	8,0-10,0	5,2-7,5	0,79-5,49	20-40

<sup>a</sup> Zigaretten von 29 handelsüblichen Marken wurden 1995 auf dem US-Markt erworben und die Gehalte im Hauptstromrauch nach Abrauchen unter Standardbedingungen (35 ml Zugvolumen in 2 Sekunden, 1 Zug/Minute, bis 3 mm vor Beginn des Filters) bestimmt. Die Einteilung in drei Gruppen erfolgte nach den Teergehalten in FF = full flavor, FFLT = full flavor low tar und ULT = ultra low tar.

<sup>b</sup> Angaben für „full flavor“ Zigaretten aus Anon (1986); TPM = total particulate matter, k. A. = keine Angabe

Der TSNA-Gehalt des Tabaks variiert stark zwischen verschiedenen Zigarettenanbietern. Ein Ländervergleich von Marlboro-Zigaretten mit gängigen Produkten nicht-amerikanischer Hersteller zeigte in 11 von 13 Ländern signifikant höhere Werte für NNN und NNK bei Marlboro-Zigaretten (Ashley et al., 2003). Es scheint also möglich, den TSNA-Gehalt von Zigarettentabak erheblich zu reduzieren. Dies bestätigt eine neue Studie, die zeigt, dass die Vermeidung von NO<sub>x</sub> in der Luft bei der Trocknung und Fermentation der Tabakblätter die Bildung von TSNA zu mehr als 90% reduziert (Nestor et al., 2003).

#### 1.6.4 *Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNN*

Von den sieben im Tabakrauch identifizierten TSNA erwies sich NNN neben NNK und NNAL als besonders starkes Kanzerogen, wogegen sein LD<sub>50</sub>-Wert für Ratten mehr als 1000 mg/kg KG beträgt (Hoffmann et al., 1975). Nach Resorption unterliegt NNN einer raschen Verteilung und Elimination (Hecht et al., 1981b). Autoradiographische Studien zeigten eine Anreicherung von NNN in Nase, Speicheldrüse und melaninhaltigem Gewebe (Brittebo und Tjälve, 1981; Löfberg et al., 1982; Waddell und Marlowe, 1980; Brittebo und Tjälve, 1980). Der erste Schritt auf dem Weg zum Kanzerogen im Organismus besteht in der metabolischen Aktivierung des NNN. Die maßgebliche Reaktion beruht auf der Bildung des ultimalen Kanzerogens aus dem Präkanzerogen mittels  $\alpha$ -Hydroxylierung, daneben finden jedoch noch diverse andere Reaktionen statt. Einen Überblick liefert Abbildung 1-17, welche Ergebnisse aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien zur Aufklärung des NNN-Metabolismus darstellt.

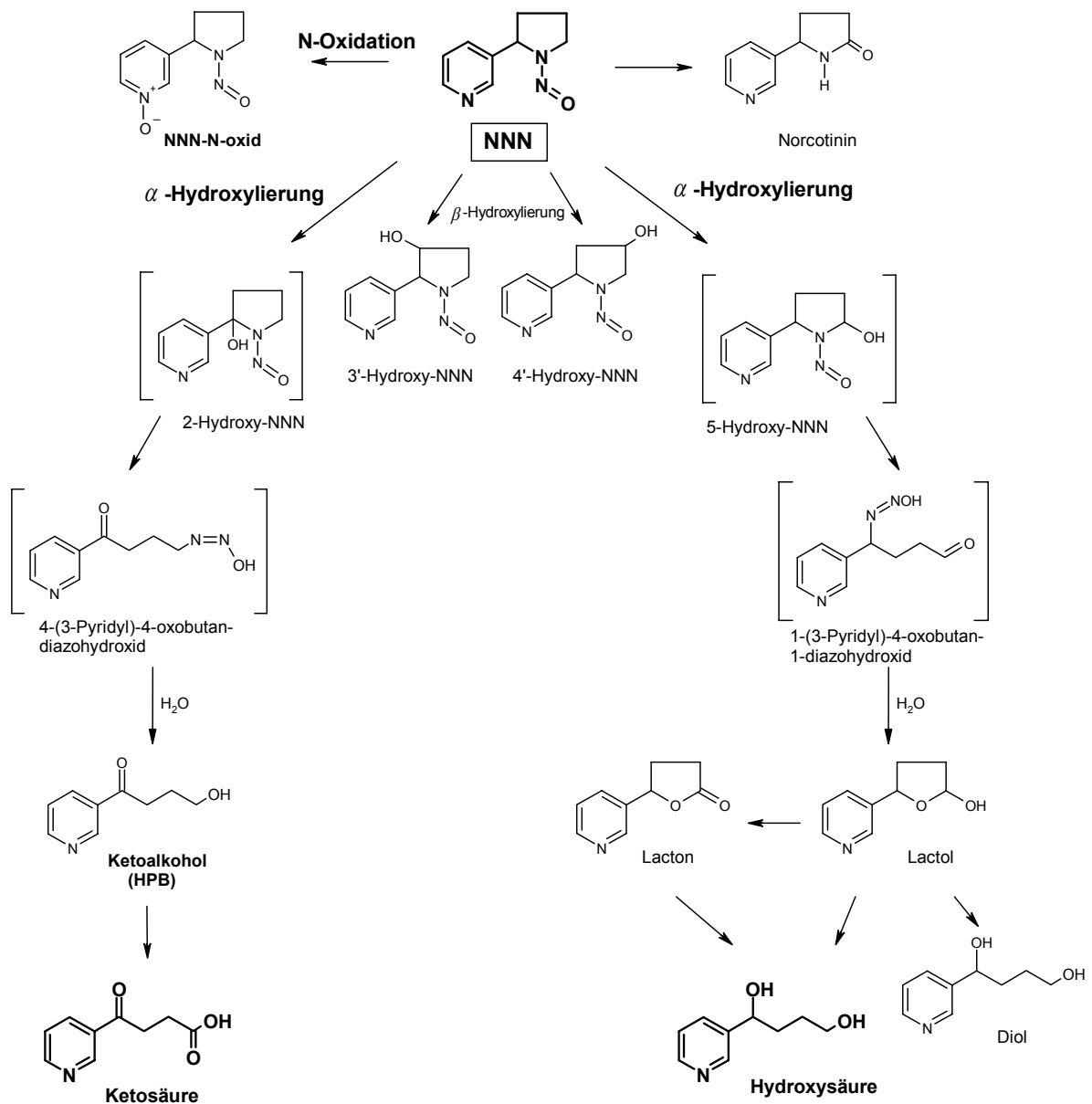
Betrachtet man den Metabolismus von NNN, so existieren im wesentlichen drei Hauptreaktionswege: Die Pyridin-*N*-Oxidation, die  $\alpha$ - sowie die  $\beta$ -Hydroxylierung des Pyrrolidinrings sowie die Bildung von Normikotin (Hecht, 1998). Der größte Teil der NNN-Metaboliten wird mit dem Urin ausgeschieden. Interessanterweise erscheinen die Metaboliten, die aus der  $\alpha$ -Hydroxylierung, der Pyridin-*N*-Oxidation und der Denitrosierung stammen, alle in Gegenwart eines kleinen Betrags an unverändertem NNN (Chen et al., 1978; Hecht et al., 1980b; Hecht und Young, 1982). Bisher liegen allerdings keine Informationen zu NNN und seinen Metaboliten in menschlichem Urin vor (Hecht, 1998).

*Pyridin-N-Oxidation:* Im Urin von Ratten erscheint das *N*-Oxid des NNN zu 7 bis 11% der verabreichten Dosis. Es existieren keine größeren Unterschiede in der Exkretion des *N*-Oxids zwischen Ratte, Hamster und Maus (Hecht et al., 1981b). Die Präsenz des aus NAB resultierenden *N*-Oxids im Rattenurin liegt mit 30% der gegebenen NAB-Dosis deutlich höher (Hecht und Young, 1982). Da die *N*-Oxide Entgiftungsprodukte darstellen, könnte dies eine Erklärung für die geringere Kanzerogenität des NAB gegenüber dem NNN sein.

*$\alpha$ - und  $\beta$ -Hydroxylierung:* Während die Metaboliten der  $\beta$ -Hydroxylierung, 3'-Hydroxy-NNN und 4'-Hydroxy-NNN, nur in Spuren im Urin nachweisbar waren, stellen 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-1-butansäure (Ketosäure) und 4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-1-butansäure (Hydroxysäure) die Endprodukte der  $\alpha$ -Hydroxylierung und zugleich die Hauptmetaboliten des NNN dar, wie in diversen Studien unter anderem an Ratten und Syrischen Goldhamstern gezeigt werden konnte (Chen et al., 1978; Hoffmann et al., 1981). Als Zwischenprodukte lassen sich

zusätzlich 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanol (Diol) und 5-(3-Pyridyl)-tetrahydrofuran-2-on (Lacton) im Urin nachweisen, wogegen 5-(3-Pyridyl)-2-hydroxytetrahydrofuran (Lactol) ausschließlich bei *in vitro* Versuchen auftritt.

**Norcotin**: Dieser Metabolit wird im Urin von NNN-behandelten Ratten und Minischweinen gefunden (Hecht et al., 1981b; Domellöf et al., 1987). Die zunächst postulierte Bildung über Denitrosierung und anschließende Oxidation von NNN konnte inzwischen ausgeschlossen werden und macht weitere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus nötig.



**Abbildung 1-17:** Die wichtigsten Abbauege im Metabolismus des tabakspezifischen Nitrosamins NNN (in Anlehnung an Hecht, 1998)

Im Urin von Patas-Affen konnten nach i.v. Applikation von NNN Hydroxysäure und Norcotinin als Hauptmetaboliten nachgewiesen werden. Daneben wurden Ketosäure, Norcotinin-1-*N*-oxid, 3'-Hydroxynorcotinin, 3'-(*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl)hydroxynorcotinin und unmetabolisiertes NNN im Urin identifiziert (Upadhyaya et al., 2002).

### **1.6.5 Möglichkeiten zur Beeinflussung des TSNA-Stoffwechsels**

Die Einflüsse von Tabakinhaltsstoffen, Ethanol oder nachgewiesenermaßen chemopräventiv wirkenden Bestandteilen von Lebensmitteln auf den NNN-Stoffwechsel wurden in einer Vielzahl von Studien zur Kanzerogenität, Mutagenität und zum *in vitro* Metabolismus untersucht. Dies geschah jedoch unter Verwendung von derart hohen Konzentrationen der beteiligten Substanzen, wie diese nie bei Konsum von Tabakprodukten im Organismus auftreten würden (Hecht, 1998). Dabei wurde unter anderem eine verminderte kanzerogene Wirkung einer Kombination aus NNN und NNK auf Lunge und Mundhöhle von F344-Ratten nach Co-Administration eines Schnupftabak-Extrakts nachgewiesen (Hecht et al., 1986). Konnte eine verminderte Aktivierung von NNK durch andere Tabakinhaltsstoffe in vielen Studien sowohl *in vivo* (Brown et al., 1999; Brown et al., 2001b; Kutzer et al., 1995; Richter und Tricker, 1994; Richter und Tricker, 2002; Tricker et al., 2001) als auch *in vitro* (Charest et al., 1989; Murphy und Heiblum, 1990; Schuller et al., 1991; Castonguay und Rossignol, 1992; Hong et al., 1992; Schulze et al., 1998) bestätigt werden, gibt es vergleichsweise wenig Informationen über eine Hemmung des NNN, die sich zudem auf *in vitro* Untersuchungen beschränken. Unter anderem wurde eine starke Hemmung des NNN-Metabolismus durch Nikotin bei kultivierten Mundschleimhautzellen der Ratte festgestellt (Murphy und Heiblum, 1990). Den gleichen Effekt zeigten Nikotin und Cotinin an mit NNN inkubierten Gewebeschnitten von Lunge und Leber bei Hamstern. Das mutagene Potenzial von NNAL, einem Hauptmetaboliten des NNK, konnte durch Nikotin, Cotinin und Tabakrauchextrakt verringert werden (Brown et al., 2001a).

Als Inhaltsstoff verschiedener Gemüsesorten der Familien *Cruciferae* und *Brassicaceae* kommt den Isothiocyanaten eine besondere Bedeutung in der Chemoprävention zu. Für verschiedene Vertreter wurde bereits eine chemopräventive Wirkung auf den TSNA-Stoffwechsel nachgewiesen. Die Effektivität einer Hemmung von Lungentumoren durch NNK hängt von der Lipophilie der Isothiocyanate und der Reaktivität gegenüber Glutathion ab. Die hemmende Wirkung steigt dabei mit zunehmender Lipophilie und sinkt bei erhöhter Reaktivität mit Glutathion (Jiao et al., 1994). Das entscheidende Strukturmerkmal für die

Hemmung stellt die Isothiocyanatgruppe dar (Jiao et al., 1996). Bei der Maus basiert der Rückgang von Lungentumoren auf einer Hemmung von P450 Isoenzymen. Dadurch kommt es zu einer verminderten metabolischen Aktivierung des NNK und in der Folge zu einer reduzierten DNA-Methylierung (Guo et al., 1993; Smith et al., 1993; Smith et al., 1990). PEITC hemmt auch die Aktivität humaner P450 Isoenzyme (Nakajima et al., 2001). Der Einfluss von Isothiocyanaten auf die  $\alpha$ -Hydroxylierung von NNN wurde schon früh beschrieben (Chung et al., 1984). Studien an F344-Ratten und A/J-Mäusen kamen zu dem Ergebnis, dass PEITC die metabolische Aktivierung von NNK reduzieren kann und damit auch die DNA-Adduktraten und das Auftreten von Lungentumoren zurückgehen (Morse et al., 1989b; Morse et al., 1989a; Morse et al., 1992). Neuere Untersuchungen zeigen verringerte HPB-Adduktraten in der Lunge von A/J-Mäusen nach Gabe von PEITC, welche auch nach Co-Administration von BITC (Benzylisothiocyanat) nicht weiter zurückgingen (Sticha et al., 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch *Boysen et al.* (2003) bei ihren Wechselwirkungsstudien auf den NNK-Metabolismus bei F344-Ratten.

Im Gegensatz zum NNK finden sich in der Literatur keine Daten über *in vivo* Effekte nach gleichzeitiger Gabe von Tabakalkaloiden, TSNA oder Isothiocyanaten auf den NNN-Metabolismus.

#### **1.6.6 Organspezifität von NNN und NNK**

Bei einer Betrachtung der Organspezifität bezüglich der Tumorigenese von TSNA muss eindeutig zwischen den untersuchten Spezies, den Dosierungen und dem untersuchten Nitrosamin unterschieden werden, da es sonst leicht zu Fehlinterpretationen kommen kann.

NNN und NNK sind systemisch wirksame Kanzerogene (Hecht, 1998; Prokopczyk et al., 1991). Man kann hinsichtlich der Tumorbildung für NNN und NNK eine klare Organspezifität feststellen. Während die Lunge als Zielorgan bei der Krebsinduktion durch NNK in allen untersuchten Nagetieren fungiert, ist dies für NNN nur bei Mäusen der Fall (Hecht, 1998). Dagegen ist nach NNN-Gabe bei Ratten hauptsächlich Tumorbildung im Nasenraum und Ösophagus zu beobachten (Hoffmann et al., 1975; Hecht et al., 1983). Die relative Häufigkeit der durch NNN induzierten Ösophagus- und Nasenraumtumoren jedoch steht in Abhängigkeit von der Applikationsart des Nitrosamins. So wurden in Studien mit F344-Ratten, welche NNN über das Trinkwasser oder flüssige Nahrung erhielten, in etwa zu gleichen Teilen Ösophagus- und Nasenraumtumoren diagnostiziert (Castonguay et al., 1984). Die subkutane Injektion von NNN bei Ratten verursachte zu einem überwiegenden Teil

Nasenraumtumoren, daneben in geringerem Maß Tumoren im Ösophagus (Hecht et al., 1980a; Hoffmann et al., 1984). Wird Ratten dagegen NNN über eine Schlundsonde verabreicht, entwickeln sich hauptsächlich Tumoren im Nasenraum, ähnlich der subkutanen Applikation (Griciute et al., 1986). Sowohl die Nasenmucosa, als auch der Ösophagus sind in der Lage, NNN metabolisch zu aktivieren, DNA-Addukte konnten in beiden Gewebearten festgestellt werden. Autoradiographische Studien belegen, dass nach intravenöser Applikation NNN bzw. seine Metaboliten in beiden Geweben gebunden vorliegen, wobei die Konzentration in der Nasenmucosa gegenüber dem Ösophagusgewebe deutlich höher ist (Brittebo und Tjälve, 1981; Löfberg et al., 1982). Möglicherweise führt der direkte Kontakt mit dem Kanzerogen über das Trinkwasser dazu, dass der Ösophagus als Zielorgan besser erreicht wird, als durch die subkutane Applikation oder das Schlündeln. Tabelle 1-4 stellt Zielorgane von NNN und NNK in Abhängigkeit der untersuchten Spezies und der Applikationsart dar.

**Tabelle 1-4: Organspezifische kanzerogene Wirkung von NNN und NNK bei der Ratte (in Anlehnung an Hecht, 1998)**

Nitrosamin	Spezies	Applikation	Zielorgan
NNN	F-344-Ratte	peroral	Ösophagus, Nase
		subkutan	Nase
		Schlündeln	Ösophagus
	Sprague-Dawley-Ratte	peroral	Nase
NNK	F-344-Ratte	peroral	Lunge, Leber, Nase, Pankreas
		subkutan	Lunge, Nase, Leber
		Schlündeln	Leber, Lunge, Nase
		intravasal	Lunge, Leber

#### **1.6.7 Die Rolle von Enzympolymorphismen beim TSNA-Metabolismus**

Enzympolymorphismus beschreibt das Auftreten genetisch bedingter, biochemisch unterscheidbarer Varianten von Enzymen. Dabei unterscheiden sich polymorphe Enzyme vor allem hinsichtlich der durch die Michaelis-Menten-Konstante charakterisierten Umsatzgeschwindigkeit, nicht jedoch in Hinblick auf Substratspezifität oder Produkt.

In molekularepidemiologischen Studien konnten mehrere Enzympolymorphismen mit Lungenkrebs in Verbindung gebracht werden (Bouchardy et al., 2001). Während für aroma-

tische Amine der Einfluss von CYP 1A2, *N*-Acetyltransferase 1 (NAT1) und 2 (NAT2) und der Glutathiontransferase (GST) auf Hämoglobin-Addukte von 3- und 4-Aminobiphenyl gezeigt werden konnte (Richter und Branner, 2002), sind vergleichbare Zusammenhänge für NNK weit weniger gesichert. Bisher konnte lediglich für CYP 2A6 ein sicherer Einfluss auf den NNK-Metabolismus in der Lunge gezeigt werden, ohne dass für dieses Isoenzym ein bedeutender Polymorphismus in der kaukasischen Bevölkerung nachgewiesen werden konnte (Paschke et al., 2001). In Bakterien, die humane Isoenzyme der CYP Reihe exprimieren, hatte neben CYP 2A6 auch CYP 2E1 eine signifikante Aktivität im NNK-Metabolismus (Kushida et al., 2000; Abdel-Rahman et al., 2000). Ein Einfluss von CYP 2E1 zeigte sich ebenfalls für humanes Bronchialgewebe (Runge et al., 2001), während für das polymorphe CYP 2A13 aus menschlicher Nase und Lunge eine große Kapazität zur  $\alpha$ -Hydroxylierung von NNK nachgewiesen werden konnte (Su et al., 2000; Zhang et al., 2002). Der in ersten Versuchen an transformierten Insektenzellen gesehene Umsatz von NNK durch das für seinen starken Polymorphismus bekannte CYP 2D6 (Crespi et al., 1991) konnte dagegen nicht bestätigt werden. Generell besteht derzeit noch kein umfassender Überblick, welchen Gesamteinfluss eine große Zahl polymorpher Enzyme (z.B. CYP1A1, CYP1B1, CYP2A13, CYP 2D6, CYP2E1, GST-M1, GST-M3, GST-P1, GST-T1, NAT1 oder NAT2) auf die Metabolismuswege des NNK haben. Zusätzliche Bedeutung für den Metabolismus besitzen neben dem Genotyp auch die Induktoren und Inhibitoren der Cytochrom-P450-Isoenzyme, welche z.T. einen größeren Einfluss auf den Phänotyp haben können.

## 1.7 Myosmin

### 1.7.1 *Entdeckung, Vorkommen, Nachweismöglichkeiten*

Myosmin war neben Nikotin eines der ersten im Tabakrauch strukturell aufgeklärten Alkaloide. Ende der 1920er Jahre wurde entdeckt, dass bei der Reduktion von Nikotyrin mit Zn/HCl neben Nikotin auch 4',5'-Dihydronornikotyrin entsteht (Späth und Bretschneider, 1928). Sowohl ein qualitativer als auch quantitativer Nachweis der Tabakalkaloide gelang mittels Papierchromatographie. Die einzelnen Alkaloide in *Nicotiana tabacum* konnten getrennt und mit anschließenden Ultraviolett-Absorptionsspektren die enthaltenen Mengen abgeschätzt werden. Ein Gesamtalkaloidanteil von 2,68% verteilt sich auf folgende Alkaloide: Nornikotin (1,42%), Nikotin (0,47%), Anabasin (0,27%), Myosmin (0,14%) (Tso und Jeffrey, 1953). Eine weitere Methode zur Bestimmung von Myosmin in Tabakproben beruht auf der Extraktion von Myosmin aus der Matrix und anschließende Aufreinigung. Nach



Derivatisierung im sauren Milieu mit *o*-Aminobenzaldehyd konnte ein Myosmingehalt von 0,09-0,14% nachgewiesen werden (Sisler, 1969). Bei der Untersuchung verschiedener Zigarettensorten wurde ein Myosmingehalt von 13-33 µg/Zigarette im Hauptstromrauch und ein Gehalt von 73-224 µg/Zigarette im Nebenstromrauch festgestellt (Sakuma et al., 1984). Ein Vergleich verschiedener Sorten Schnupftabak ergab Myosmingehalte zwischen 0,001 und 0,003% bezogen auf getrockneten Tabak (Brunnemann et al., 2002).

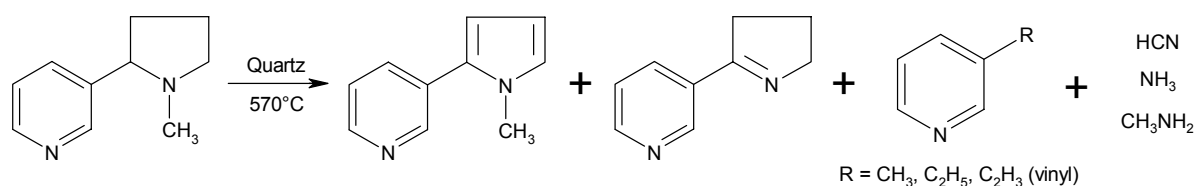
Myosmin konnte ausser in Tabakpflanzen noch in weiteren Pflanzen nachgewiesen werden: So wurde es in den Blättern und Wurzeln von *Duboisia hopwoodii* gefunden. Wegen ihrer narkotischen Wirkung werden die Blätter dieser australischen Pflanze von den Aborigines gekaut (Luanratana und Griffin, 1982). Die Entdeckung von Myosmin in verschiedenen Nussproben erweiterte das Spektrum seines Vorkommens schließlich weit über Tabakprodukte hinaus und erschloss gänzlich neue Wege der Myosmin-Exposition. Die gefundenen Mengen reichen an die durch Passivrauch aufgenommenen Konzentrationen heran (vgl. Kapitel 4.2; Zwickenpflug et al., 1998).

Aufgrund dieser Befunde und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann wohl nicht länger von **tabakspezifischen** Alkaloiden und in der Folge von **tabakspezifischen** Nitrosaminen gesprochen werden.

### 1.7.2 Synthese

Neben der Synthesemöglichkeit nach *Späth und Bretschneider* (1928) gibt es noch weitere Verfahren, bei denen Myosmin in unterschiedlich reiner Form erhalten wird.

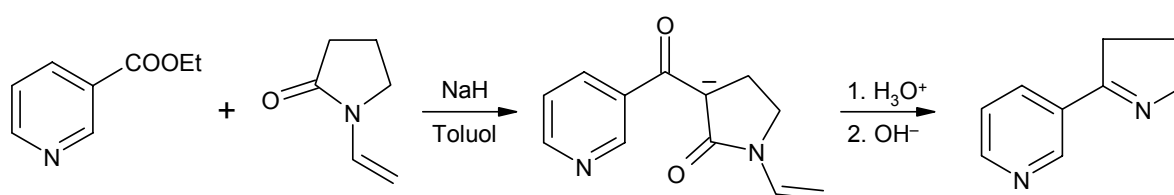
So wurde eine Pyrolyse von Nikotin am Quarz-Kontakt bei Temperaturen von 570 °C beschrieben (Abbildung 1-18). Dabei entsteht neben verschiedenen anderen Produkten auch Myosmin in Ausbeuten von ca. 33% basierend auf der Menge pyrolysierten Nikotins (Woodward et al., 1944).



**Abbildung 1-18: Pyrolyse von Nikotin**

Andere Synthesewege beruhen ebenfalls auf der Umwandlung anderer Tabakalkaloiden. So konnte durch Luftoxidation von Nikotin bei 30 °C nach vier Wochen neben verschiedenen anderen Verbindungen auch Myosmin nachgewiesen werden. Auch die Behandlung von Nikotin im Autoklaven mit Säure (pH 5) bei 200 °C liefert nach drei Tagen unter anderem Myosmin (Kisaki et al., 1978).

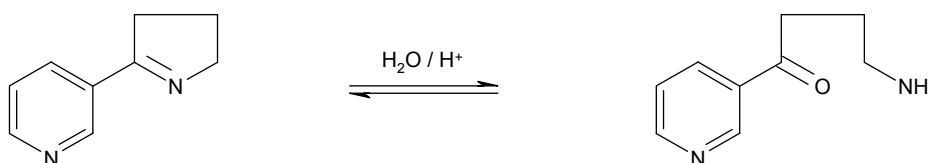
Eine gängige und bis heute verwendete Synthese von Myosmin aus Nikotinsäureethylester und *N*-Vinylpyrrolidon wurde von *Brandänge und Lindblom* (1976) vorgeschlagen (Abbildung 1-19).



**Abbildung 1-19:** Darstellung von Myosmin

### 1.7.3 Physikalisch-chemische und toxikologische Eigenschaften

Aus der Beobachtung, dass Myosmin mit wässriger Hydroxylamin-Lösung als Carbonyl-Komponente reagiert, wurde auf das in Abbildung 1-20 dargestellte reversible Hydrolysegleichgewicht geschlossen (Brandänge und Rodriguez, 1983). Aufgrund von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren war es möglich, die pH-Abhängigkeit dieses Gleichgewichts zu beschreiben. So liegt im sauren pH-Bereich hauptsächlich die Aminoketon-Form vor, während im alkalischen die Ringform dominiert. Bei einem pH-Wert von 6,8 liegt Myosmin lediglich zu 1% in der offenkettigen Form vor (Brandänge und Rodriguez, 1983; Zoltewicz et al., 1989). Da sich mit steigendem Anteil an offenkettiger Form auch die Hydrophilie der Verbindung erhöht, lässt sich das beschriebene Gleichgewicht effektiv für analytische Zwecke ausnützen.



**Abbildung 1-20:** Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin im sauren Milieu

Der Extraktion aus biologischem Material nicht förderlich ist jedoch die fehlende Wasserdampflichkeit. Im Gegensatz zu Nikotin können Nornikotin, Anabasin und Myosmin, die alle eine cyclische sekundäre Aminogruppe enthalten, nicht mittels Wasserdampfdestillation aus einem Gemisch extrahiert werden (Woodward et al., 1944).

Es wurden noch weitere Parameter für eine eindeutige Identifizierung von Myosmin bestimmt. So unter anderem der Schmelzpunkt der Verbindung, der zwischen 39 und 42 °C liegt (Brandänge und Lindblom, 1976). Infrarotspektren liefern ein Absorptionsmaximum bei  $\nu_{C=N} = 1618 \text{ cm}^{-1}$  (Brandänge und Lindblom, 1976; Witkop, 1954; Korte und Schulze-Steinen, 1962). Das Maximum der Absorption ultravioletter Strahlung liegt bei  $\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$  (Swain et al., 1949).

Eine Elementaranalyse sollte folgendes Ergebnis liefern: Ber.: C 73,97, H 6,85, N 19,18 (Woodward et al., 1944). Auf die massenspektrometrischen Eigenschaften von Myosmin wird in Kapitel 3.2.1.2 näher eingegangen.

Aus toxikologischer Sicht ist Myosmin bislang noch wenig erforscht. Der LD<sub>50</sub>-Wert bei der Ratte liegt zwischen 190 mg/kg (i.p.) und 1875 mg/kg (oral) (Ambrose und DeEds, 1946). Bei Mäusen wurde über den Zeitraum von 50 Wochen täglich 0,5 mg Myosmin verabreicht. 76% der Tiere überlebten den Versuch, wogegen bei der Kontrollgruppe 98% überlebten (French et al., 1957). Im Ames-Test zeigt Myosmin keine mutagenen Eigenschaften, jedoch konnte die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli* *polA*<sup>+</sup>/*polA*<sup>-</sup> beobachtet werden (Riebe et al., 1982). Ein Anstieg des spontanen Schwester-Chromatid-Austausches in Ovarzellen von Hamstern nach *in vivo* Behandlung konnte nicht festgestellt werden (Riebe und Westphal, 1983). Bei Untersuchungen an Nasenschleimhautzellen und menschlichen Lymphozyten zeigte der COMET-Assay DNA-Schäden nach Inkubation mit Myosmin (Kleinsasser et al., 2003). Auch konnte *in vitro* eine kovalente Bindung an Kalbsthymus-DNA nach Behandlung mit radioaktiv markiertem Myosmin unter Nitrosierungsbedingungen bei pH 3-5 festgestellt werden (Wilp et al., 2002b).

#### 1.7.4 Nitrosierung

Die Nitrosierung von Myosmin wurde erstmalig von Zwickenpflug (2000) detailliert beschrieben. Er untersuchte die direkte Nitrosierung von Myosmin mit N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in Pufferlösungen der pH-Werte 5,5, 7,5 und 9. Es resultierte ein pH-abhängiges Produktgemisch aus NNN und dem Ketoalkohol 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB).

Diese Nitrosierungsprodukte konnten auch in humanem Magensaft, dem Myosmin und  $\text{NaNO}_2$  zugesetzt wurde, nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung liefert das reversible Hydrolysegleichgewicht des Myosmins. Unter sauren Bedingungen hydrolysiert Myosmin zur offenkettigen Aminoketonform, und die Nitrosierung des primären Amins führt zu einem instabilen Diazohydroxid, von dem man annimmt, dass es *in situ* zum Ketoalkohol hydrolysiert. Höhere pH-Werte begünstigen dagegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins (Abbildung 1-21). Bei niedrigen pH-Werten kleiner 2 wird allerdings ebenfalls mehr NNN als HPB gebildet (Wilp et al., 2002b).

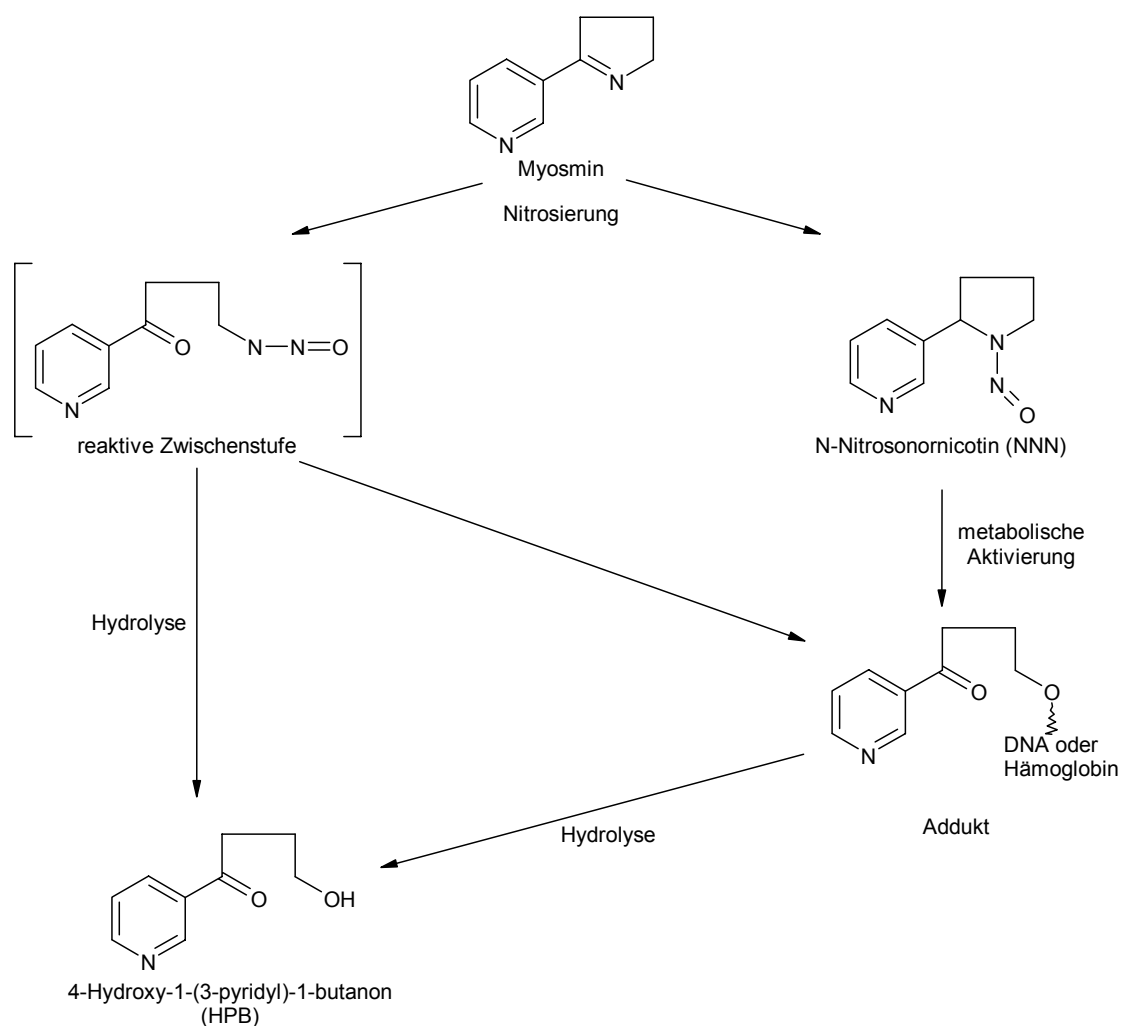


Abbildung 1-21: Nitrosierung von Myosmin

### 1.7.5 Relevanz von Myosmin für die Kanzerogenese

Bislang wurde im Myosmin-Stoffwechsel von einer zweistufigen Reaktionsfolge ausgegangen. Im ersten Schritt wird Myosmin zum NNN nitrosiert. Anschließend erfolgt eine

metabolische Aktivierung, die über ein Diazohydroxid führt, dessen Weiterreaktion zu einer kovalenten Bindung mit DNA bzw. mit Proteinen führen kann. Ein Nachweis solcher Addukte konnte mittels hydrolytischer Spaltung und Nachweis des frei gewordenen HPB geführt werden. *Hecht et al.* (1981b) führten Versuche an F344 Ratten durch, bei denen nach Myosmin-Gabe 4-Oxo-4-(3-pyridyl)butansäure (Ketosäure) im Urin nachgewiesen werden konnte. Diese Verbindung entsteht auch im Zuge des NNN-Metabolismus aus HPB.

Die Erkenntnisse aus der Myosmin-Nitrosierung liefern dagegen neuen Interpretationsstoff. Aufgrund der direkten Bildung von HPB ist demnach eine metabolische Aktivierung des Nitrosierungsprodukts im Organismus nicht zwingend erforderlich, um eine DNA- oder Protein-Bindung zu ermöglichen. Aus der Reaktionsfolge wird ersichtlich, dass bei der Bildung von HPB eine instabile Zwischenstufe durchlaufen wird, welche ebenfalls das Potenzial für eine Bindung an DNA oder Proteine mitbringt. Die Adduktbildung erfolgt also in einer sehr viel direkteren Reaktionsfolge als bislang angenommen. Das bedeutet, dass bei Vorhandensein von nitrosierenden Verbindungen im sauren Milieu bereits ohne Zutun des Organismus aus Myosmin eine Spezies entstehen kann, die kanzerogenes Potenzial besitzt. Aktuelle Untersuchungen konnten außerdem die Bildung von HPB nach Inkubation von Myosmin mit Wasserstoffperoxid belegen (Zwickenpflug, persönliche Mitteilung). Da  $H_2O_2$  auch *in vivo* vorhanden ist, scheint eine Beteiligung dieses Reaktionsweges am Myosmin-Metabolismus möglich.

Damit in Zusammenhang stehen auch Untersuchungen, die einen eindeutigen Anstieg des Krebsrisikos u. a. für Ösophagus, Magen, Colon und Rectum mit dem zunehmenden Konsum von Getreideprodukten, Nudeln und Reis in Verbindung bringen (Chatenoud et al., 1999). Da in der vorliegenden Arbeit Myosmin in einer breiten Palette von Nahrungsmitteln nachgewiesen werden konnte, ist ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Forschungsergebnissen nicht generell auszuschließen.

## 1.8 Biomonitoring

Jeder Mensch ist in nahezu allen Bereichen des täglichen Lebens dem Kontakt mit Fremdstoffen unterschiedlichster Natur ausgesetzt. Besondere Aufmerksamkeit muss auf genotoxische Stoffe gerichtet werden, die nicht nur mutagene und kanzerogene, sondern auch neurotoxische, teratogene, embryotoxische und andere toxische Effekte auf die diversen Zielorgane ausüben (van Welie et al., 1992).

Die Messung von Fremdstoffen in der Umwelt, wie in Luft- und Wasserproben, das sogenannte Monitoring, vernachlässigt die Resorption, Distribution, und den Metabolismus eines Stoffes im Individuum. Das „Biomonitoring“ hingegen, streng definiert als die Messung von Fremdstoffen in verfügbaren Körperflüssigkeiten (Lewalter und Korallus, 1985), stellt eine Methode dar, den Stoff, seine Metaboliten oder seine *in vivo* Reaktionsprodukte im Körper zu messen (van Welie et al., 1992). Den entscheidenden Metaboliten, der durch das Biomonitoring erfasst wird, bezeichnet man als Biomarker. Im Gegensatz zum **Biomarker der internen Dosis**, der ausschließlich eine Aussage über die durch die Exposition vorliegende Belastung macht, liefert der **Biomarker der biologisch effektiven Dosis** auch eine Information über die Beanspruchung des Individuums und stellt somit eine individuelle Größe dar. Typische messbare Variablen für die effektive Dosis sind DNA- und Proteinaddukte.

Der **Biomarker der Wirkung** gibt die Reaktion des Organismus auf die Belastung wieder. Hier sind frühe biologische Effekte, wie Chromosomenveränderungen und Mutationen zu nennen (Berlin et al., 1984; Bridges et al., 1982).

**Biomarker der Empfindlichkeit** berücksichtigen die unterschiedliche Suszeptibilität der Individuen, die oftmals durch abweichende Enzymaktivitäten hervorgerufen wird. Infolgedessen fallen der Nachweis von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen und die Bestimmung der Enzymaktivität bei Polymorphismen in diesen Bereich.

### 1.8.1 Protein-Addukte

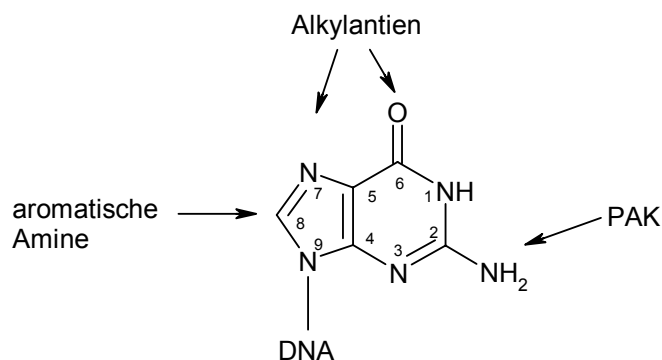
Die Grundlage für die Bestimmung von kovalenten Proteinaddukten zur Erfassung der Exposition des Menschen mit Kanzerogenen lieferten *Ehrenberg et al.* (1974). An Proteine als Biomarker werden diverse Anforderungen gestellt. Hierunter fallen die chemische Stabilität des Addukts unter biologischen Bedingungen, die hinreichende Stabilität des Proteins, die auch durch die Adduktbildung nicht beeinträchtigt werden darf, sowie eine leichte Zugänglichkeit für epidemiologische Studien. Außerdem sollte eine Korrelation zwischen Protein- und DNA-Dosis bestehen und die Verfolgung über einen längeren Zeitraum hinweg praktikabel sein. Recht schnell wurde festgestellt, dass Hämoglobin viele dieser Vorteile in sich vereinigt, so dass es als bevorzugtes Protein für die Entwicklung von analytischen Methoden des Biomonitorings eingesetzt wurde (Groth und Neumann, 1971; Wieland und Neumann, 1978). Die Bildung von Addukten ist für Hämoglobin im Normalfall kein toxikologisch relevantes Ereignis, stellt aber ein Maß für die stattgefundene Aktivierung des

Kanzerogens dar. Häufig besteht eine Korrelation zwischen Hämoglobin- und DNA-Addukten. Daher werden Hämoglobinaddukte auch als „Surrogatmarker“ für genotoxische Schäden bezeichnet. Hämoglobin besitzt mit durchschnittlich 120 Tagen eine außergewöhnlich lange Lebensdauer, so dass bei einer chronischen Belastung mit Kanzerogenen eine Aussage zur kumulativen Exposition über den Zeitraum der Lebenszeit der Erythrozyten getroffen werden kann. Bildet das Kanzerogen ein stabiles Addukt, so wird die Menge des Adduktes proportional zum Lebensalter des Hämoglobins sein: 120 Tage alte Hb-Moleküle werden 120 mal so hohe Adduktkonzentrationen besitzen wie die Hb-Moleküle, die nur einen Tag alt sind. Der durchschnittliche Wert beträgt die Hälfte der Maximalkonzentration und damit in etwa das 60-fache der täglichen Dosis des Kanzerogens, selbst dann, wenn dessen Zufuhr unregelmäßig erfolgt (Skipper und Tannenbaum, 1990). Häufig werden die reaktiven Elektrophile jedoch nicht im Erythrozyten selbst gebildet, wie dies bei aromatischen Aminen der Fall ist, sondern müssen aus den Zellen, in denen der aktivierende Metabolismus stattfindet, erst in die Erythrozyten einwandern. Dies setzt eine ausreichende Stabilität und Lipophilie der ultimalen elektrophilen Form des Kanzerogens voraus.

Weitere Vorteile des Einsatzes von Hämoglobin im Rahmen eines Biomonitorings bestehen darin, dass es im Blut in großen Mengen (120-160 mg/ml) präsent ist und in der leichten Zugänglichkeit, was insbesondere bei groß angelegten epidemiologischen Studien von Bedeutung ist (Eisenbrand und Metzler, 1994).

### **1.8.2 DNA-Addukte**

Nach metabolischer Aktivierung bilden Kanzerogene über eine kovalente Bindung Addukte mit Makromolekülen. Prinzipiell kann eine Bindung an allen Stickstoff- und enolisierten Sauerstoffatomen der Nukleinsäurebasen und den Hydroxylgruppen der Phosphorsäure erfolgen, die Adduktbildung beruht jedoch auf spezifischen elektronischen und stereochemischen Parametern (Weinstein, 1983; Gupta, 1984). Kanzerogene greifen überwiegend an den Guaninbasen an, wobei die Position des Angriffs wiederum von der chemischen Struktur des Kanzerogens abhängig ist. Zum Beispiel zielen Alkylantien hauptsächlich auf die N7- und die O6-Position ab, während aromatische Amine und PAK die Positionen C8 und N<sup>2</sup> des Guanins favorisieren (Abbildung 1-22; Beach und Gupta, 1992).



**Abbildung 1-22: Reaktive Zentren des Guanins für diverse Elektrophile (modifiziert nach Beach und Gupta, 1992)**

Zusätzlich bestehen Bindungsmöglichkeiten an anderen Stellen des Guanins und an weiteren Basen der DNA, was eine Vielzahl an Adduktmöglichkeiten eines einzelnen Kanzerogens zur Folge hat.

Trotz des offensichtlichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Addukten und der Exposition, scheint das Ausmaß des DNA-Schadens an den spezifischen Stellen hinsichtlich der Kanzerogenität die entscheidendere Rolle zu spielen. Bei vielen chemischen Substanzen lässt sich aufgrund ihrer DNA-Adduktbildung allgemein die Organotropie von Tumoren vorhersagen (Kadlubar, 1994; Poirier und Beland, 1992). In Zielorganen einer bestimmten Klasse von Kanzerogenen kann die Bindung an die DNA mit der kanzerogenen Wirksamkeit korreliert werden (Perera, 1988). Direkt reaktive Kanzerogene, wie Ethylenoxid, alkylieren die DNA in diversen Gewebearten in etwa dem gleichen Ausmaß (Segeberäck, 1983; Segeberäck, 1985).

DNA-Addukte, die vor der Zellreplikation nicht oder falsch repariert wurden, können zu Gen-Mutationen führen, oder exponierte Zellen dazu veranlassen, sich in irreversibel veränderte Präneoplasien umzuwandeln (Perera, 1988; Harris, 1985). Liegt einmal eine Initiierung der Zelle vor, werden theoretisch die nachfolgenden Stadien der Promotion und Progression bis hin zu potenziell bösartigen Zell- bzw. Gewebsveränderungen durchlaufen (Harris, 1985). Somit repräsentieren DNA-Addukte einen frühen, nachweisbaren und kritischen Schritt in der chemischen Kanzerogenese und können als internes Dosimeter der Exposition mit Kanzerogenen betrachtet werden (Henderson et al., 1989; Wogan, 1989; Weinstein, 1981).



### 1.8.2.1 Analyse von DNA-Addukten

Der erste Weg, die kovalente Bindung von Chemikalien an der DNA nachzuweisen, bestand im Einsatz von radioaktiven chemischen Kanzerogenen. Infolge dessen mussten die DNA-Adduktstudien auf diejenigen Chemikalien beschränkt werden, die in Isotopen-markierter Form zur Verfügung standen. Im Rahmen dieser Methode wurden dann im Anschluss an die Isolierung und Hydrolyse der DNA die Addukte szintillographisch bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 5 Addukten in  $10^8$  Nukleotiden, unter Einsatz von 1 mg DNA und hochreaktiven Substanzen mit hoher spezifischer Markierung (Dragstedt, 1994). Weiterhin wurden folgende Nachweismethoden etabliert:

- **Immunoassays:** Die am häufigsten eingesetzten Nachweismethoden für DNA-Addukte mit Antikörpern sind der RIA (Radioimmunoassay) und der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Die wesentlichen Vorteile der vorgestellten Methoden liegen in der recht hohen Empfindlichkeit (1 Addukt in  $10^8$  Nukleotiden unter Einsatz von 25-50  $\mu\text{g}$  DNA), und der Möglichkeit, einen ganzen Satz strukturell ähnlicher DNA-Addukte in der gleichen Probe zu suchen (Poirier, 1994).
- **Fluoreszenzspektroskopie:** Die Notwendigkeit einer starken Fluoreszenz der nachzuweisenden Substanzen, beispielsweise PAK, schränkt den Einsatz des bisherigen Verfahrens ein (Jankowiak et al., 1998). Durch Derivatisierung mit fluoreszierenden Reagenzien werden neuerdings hochempfindliche Verfahren entwickelt (Wang und Giese, 1998).
- **$^{32}\text{P}$ -Postlabeling:** Als eine der bislang empfindlichsten Methoden zur Detektion von Interaktionen der DNA mit chemischen Kanzerogenen wurde Anfang der 80er Jahre von Reddy, Gupta und Randerath das  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling entwickelt (Reddy et al., 1981; Gupta et al., 1982), das mittlerweile diverse Modifikationen erfahren hat. Die Nachweisempfindlichkeit bewegt sich in einer Größenordnung von 1-10 Addukten in  $10^{10}$  Nukleotiden bei Verwendung von 10  $\mu\text{g}$  DNA (Beach und Gupta, 1992).
- **Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS):** Zur Analyse von DNA-Addukten werden die Addukte von der DNA abgespalten, aufgereinigt und nach Derivatisierung quantitativ erfasst. Die Zuordnung der Peaks erfolgt über die charakteristische Retentionszeit und das Massenspektrum der eluierten Komponente. Um eine exakte Quantifizierung zu erreichen, sowie Verluste, Fehler bei der Aufbereitung und die aktuelle Empfindlichkeit festzustellen, wird ein stabiler Isotopenstandard möglichst früh im Analysengang zugesetzt. Abhängig von der verfügbaren Menge an DNA liegt der Nachweis-

bereich zwischen 1 Addukt in  $10^6$  Nukleotiden für 1  $\mu\text{g}$  DNA und  $1/10^9$  für 1 mg DNA (Friesen et al., 1994; Airoidi et al., 2002). Allerdings liefert die Methode keine Aufklärung über die Struktur des DNA-Addukts, da dieses bereits vor der Messung mittels GC-MS von der DNA gespalten wird.

### 1.8.3 *TSNA-Addukte als Biomarker der Tabakexposition*

Der gebräuchlichste Biomarker für die Exposition mit Tabakprodukten ist das Cotinin, der Hauptmetabolit des Nikotins (Benowitz, 1996). Außerdem werden Messungen von Carboxyhämoglobin und Thiocyanat als Indikatoren für eine Tabakrauchbelastung durchgeführt (Scherer und Richter, 1997). Aufgrund der fehlenden Kanzerogenität dieser Verbindungen ist allerdings keine direkte Information über ein vorliegendes Krebsrisiko möglich. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[a]pyren und aromatische Amine wie 4-Aminobiphenyl berücksichtigen als Biomarker für kanzerogene Tabakrauchkomponenten zwar diesen Aspekt, besitzen aber aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens keine hinreichende Spezifität für Tabakprodukte. Ein Biomarker für die tabakspezifischen Nitrosamine, deren Vorkommen auf Tabakprodukte beschränkt zu sein scheint, sollte spezifisch eine Exposition mit Tabak anzeigen (Hecht, 2002; Scherer und Richter, 1997).

Nach metabolischer Aktivierung sind die beiden tabakspezifischen Nitrosamine mit dem stärksten kanzerogenen Potenzial, NNN und NNK, in der Lage, DNA- und Proteinaddukte zu bilden. Abbildung 1-23 zeigt die Reaktionswege im Überblick.

Der Metabolismus erfolgt unter Beteiligung des Enzymsystems Cytochrom P450 des endoplasmatischen Retikulums und führt zu instabilen Hydroxynitrosaminen **1-4**. Intermediat **1** zerfällt spontan zu Ketoaldehyd **5** und Methyldiazohydroxid **6**, welches als alkylierendes Agens Makromoleküle angreift. Es entsteht jedoch hierbei kein für die Exposition mit Tabakwaren spezifisches Addukt, da eine Vielzahl anderer Verbindungen ebenfalls Methylierungspotenzial besitzt. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das *N*-Nitrosodimethylamin (Törnqvist et al., 1988). Die instabile Zwischenstufe **2** zerfällt zu Formaldehyd und einem Diazohydroxid **7**, welches die Pyridyloxobutylierung von DNA oder Hämoglobin bewirken kann. Das resultierende Addukt setzt nach Hydrolyse den Ketoalkohol (HPB) **9** frei. Über Zwischenstufe **3** entsteht aus NNN das gleiche Addukt, so dass entsprechend nach hydrolytischer Spaltung wiederum der Ketoalkohol **9** resultiert. Über das Verhalten und eine eventuelle Adduktbildung durch das Diazohydroxid **8** ist bisher nichts bekannt. Einige der nach Pyridyloxobutylierung von DNA resultierenden Addukte konnten strukturell aufgeklärt

werden (Wang et al., 2003). Ebenso gibt es Erkenntnisse über den rein chemischen Reaktionsmechanismus von HPB mit Nucleophilen, wie z.B. Thiolen, im sauren Milieu (Peterson et al., 2003).

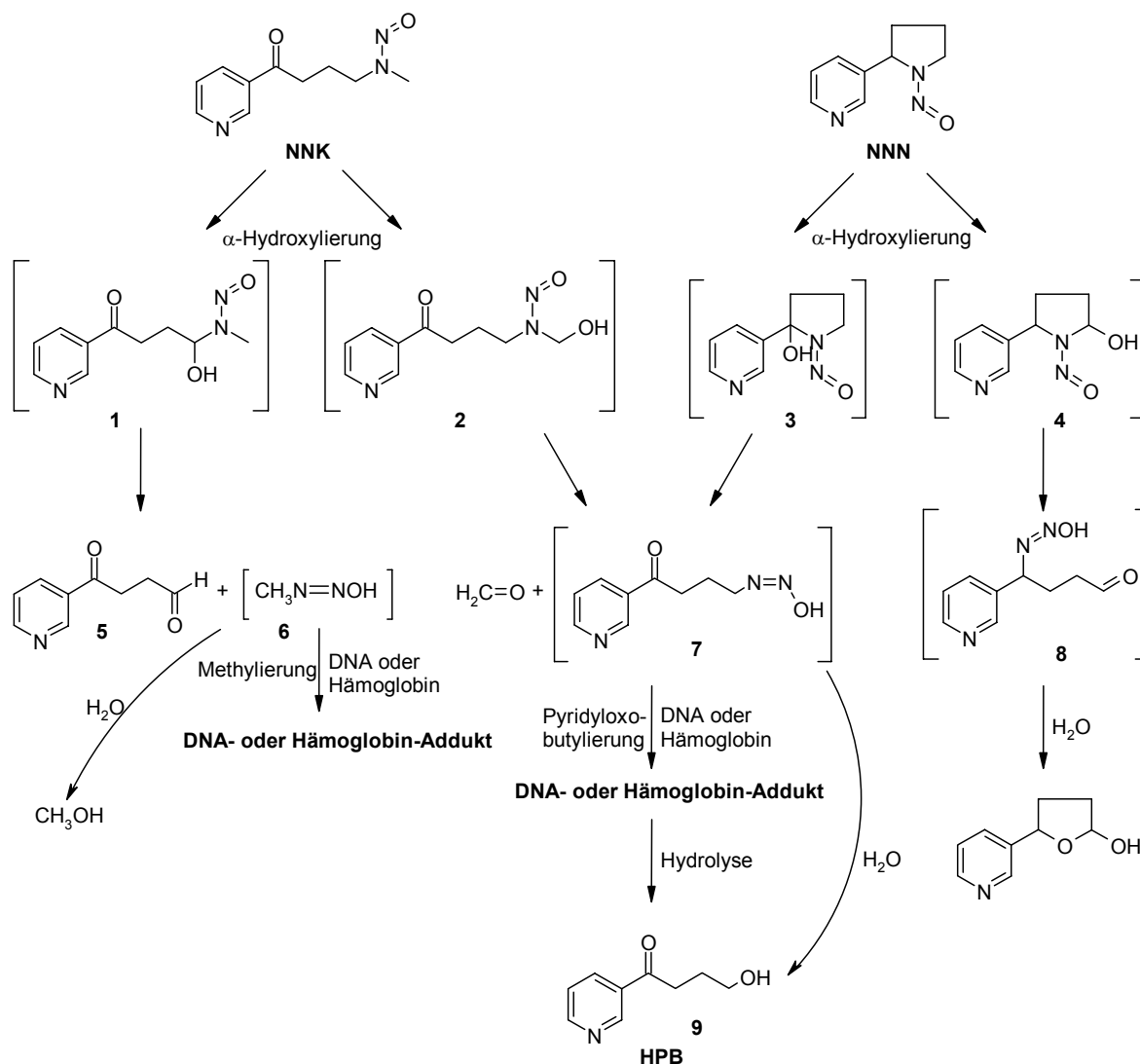


Abbildung 1-23 Metabolische Aktivierung von NNK und NNN und Bildung von DNA- bzw. Hämoglobinaddukten (nach Richter, 1996a)

Die ersten Beweise für die Bildung von Hämoglobinaddukten durch NNN und NNK lieferte ein von *Carmella und Hecht* (1987) durchgeführter Rattenversuch mit tritiummarkierten TSNA. An Ratten konnte auch gezeigt werden, dass über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg sowohl eine lineare Korrelation mit der Dosis als auch eine Korrelation zwischen den HPB freisetzenden Addukten am Hämoglobin und den HPB-Addukten von Leber und Lunge besteht (Murphy et al., 1990). Auch für andere Kanzerogene ist die Hb-Adduktbildung proportional zur verabreichten Dosis (lineare Dosisabhängigkeit) (Neumann, 1980; Pereira

und Chang, 1981; Osterman-Golkar et al., 1983). Bei aromatischen Aminen wurde ebenfalls eine enge Beziehung zwischen dem Ausmaß der Hb-Bindung und der Bindung der Kanzerogene im Gewebe und an der DNA festgestellt (Neumann, 1980; Neumann, 1984; Neumann et al., 1995).

Diese Beobachtungen würden die Bestimmung von HPB-Hämoglobinaddukten als Biomarker für eine Tabakexposition sinnvoll erscheinen lassen. Da sich andere Biomarker für die Tabakrauchbelastung wie Cotinin und NNAL beim Raucher und ETS-belasteten Nichtraucher um den Faktor 100 unterscheiden, ging man von einer Differenz in etwa der gleichen Größenordnung auch für die HPB-Addukte aus. Die Untersuchungen von drei unabhängigen Arbeitsgruppen in USA, Deutschland und Frankreich zeigten jedoch, dass sich der Unterschied des HPB-Adduktniveaus beim Raucher und Nichtraucher lediglich auf das Zweifach- bis Dreifache beläuft (Carmella et al., 1990; Atawodi et al., 1998; Falter et al., 1994; Branner et al., 1998). Auch konnte für Lunge, Ösophagus und Cardia keine Korrelation von HPB-abbauenden DNA-Addukten mit HPB-freisetzenden Hämoglobin-Addukten festgestellt werden. Die geringen Unterschiede der Hämoglobin-Adduktraten bei Rauchern und Nichtrauchern bestätigte zusätzlich die These, dass Hb-Addukte nicht als Surrogatmarker für DNA-Addukte, resultierend aus dem Genuss von Tabakprodukten, geeignet sind (Hölzle, 2003).

Bislang konnte nicht geklärt werden, warum dieser Biomarker keine ausreichende Spezifität für die Belastung mit TSNA besitzt. Möglicherweise liegt ein Grund in der unterschiedlichen Verstoffwechslung von NNN und NNK bei Rauchern und Nichtrauchern. So ist bekannt, dass Nikotin, Cotinin und auch der Zigarettenrauch selbst die Aktivierung von NNK hemmen (Brown et al., 2001b; Richter und Tricker, 1994). Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass Tabak bzw. Tabakprodukte nicht die einzigen Quellen für dieses Addukt darstellen, sondern eine hohe Hintergrundbelastung anderen Ursprungs existiert. So könnte zum Beispiel Myosmin aus bestimmten Nahrungsmitteln zu diesem Addukt-Plateau beitragen. Dies könnte zur Folge haben, dass die zusätzliche Belastung mit Tabakrauch den Adduktlevel bei Rauchern nur noch geringfügig ansteigen lässt und die Unterschiede in den Adduktniveaus zwischen Rauchern und Nichtrauchern nivelliert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Gaschromatograph-Massenspektrometer:

*System 1:*

GC: HP5890 series II, Hewlett Packard, Waldbronn

Mass Selective Detector: HP 5972 series, Quadrupol, Hewlett Packard, Waldbronn

Autosampler: HP 7673, Hewlett Packard, Waldbronn

*System 2:*

GC: Fisons 8060, Fisons Instruments, Mainz

Mass Selective Detector: Trio 1000 Quadrupol, Fisons Instruments, Mainz

Autosampler: AS 800, Fisons Instruments, Mainz

Auswertungssoftware: MassLab Ver. 1.3, Fisons Instruments, Mainz

*System 3:*

GC: Varian 3400, Varian, Darmstadt

Mass Selective Detector: Finnigan MAT 95Q, Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen

Autosampler: A200S, Varian, Darmstadt

- GC/MS-Peripherie:

Vakuumpumpe: Edwards High Vacuum Pump E2M8 Two Stage, Edwards High Vacuum Int., Part of BOC Ltd., Crawley, Sussex, England

Kühlwasserbad: Multitemp 2209, LKB Bromma, Colora Messtechnik GmbH, Lorch

- GC-Säulen:

DB-5 Kapillarsäule (30 m Länge, 0,2 mm I.D., 0,33 µm Filmdicke), J&W Scientific, Folsom (CA), USA

Zebron ZB-50 Kapillarsäule (30 m Länge, 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke), Phenomenex, Aschaffenburg

CS Supreme-5 (25 m Länge, 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke), Chromatographie Service, Langerwehe

- High Performance Liquid Chromatography:

*System 1:*

On-line Degasser Modell ERC-3315, GynkoteK, München

Gradientenpumpe Modell 480, GynkoteK, München

Automatischer Probengeber Modell 231, Abimed, Düsseldorf

On-line UV-Detektor Modell 160, GynkoteK, München

On-line Radioaktivitätsdetektor RAMONA 2000 mit einer 700 µl-Durchflußzelle, Raytest, Straubenhardt

Auswertungssoftware Winnie 32 Ver. 2.1, Raytest, Straubenhardt

*System 2:*

On-line Degasser Modell ERC-3315, GynkoteK, München

Gradientenpumpe Modell 480, GynkoteK, München

Automatischer Probengeber Gina 50, GynkoteK, München

On-line Diodenarray-UV/VIS-Detektor UVD 340 S, GynkoteK, München

On-line Radioaktivitätsdetektor RAMONA Star mit einer 250 µl Durchflußzelle, Raytest, Straubenhardt

Auswertungssoftware Chromeleon Version 4.10 Build 280, Softron GmbH, Germering

Auswertungssoftware Gina Star Ver. 2.14, Raytest, Straubenhardt

*System 3:*

Gradientenpumpe Intelligent Pump L-6200, Merck-Hitachi

Automatischer Probengeber AS-2000A, Merck-Hitachi

On-line UV-Detektor L-4000, Merck-Hitachi

On-line Radioaktivitätsdetektor LB 506 C, Berthold, Bad Wildbad

- HPLC-Säulen:

HPLC-Vorsäule LiChroCart guard column gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4 × 4 mm, Merck, Darmstadt

HPLC-Hauptsäule gefüllt mit LiChrospher 60 RP-18 selectB, 5 µm, 250 × 4 mm, Merck, Darmstadt

HPLC-Hauptsäule gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 × 3 mm, Merck, Darmstadt

- LC/MS:

HPLC: Agilent 1100 Series, Agilent, Böblingen

MS: Sciex API 2000, Applied Biosystems, Darmstadt

- Zentrifugen:

Minifuge GL, Bachhofer, Reutlingen

Minizentrifuge 16 R, Hettich, Tuttlingen

Vacuum Concentrator RCT 90, Jouan, Unterhaching

- NMR-Gerät: Bruker ARX 300, Bruker Physik AG, Karlsruhe

- Analysenwaage A-150-SX, COBOS, Spanien
- Digital pH-Meter, Firma Knick Elektronische Messgeräte GmbH und Co., Berlin
- GC-Spritze in der Größe 10 µl, Hamilton, Frankfurt
- Labormühle Braun KMM 30, Braun AG, Kronberg
- KPG-Rührer, Janke & Kunkel KG, Staufen
- Magnetrührer IKA Combimag RCT, Jahnke & Kunkel GmbH und Co. KG, Staufen i. Breisgau
- Mettler PC440 Waage, Delta Range, Gießen
- Pipetten, 10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Eppendorf, Hamburg
- Rotationsverdampfer, Büchi, Glasapparatefabrik Flawil, Schweiz
- Stoffwechselkäfige aus Edelstahl, ACME Research Products, Cincinnati, Ohio, USA
- Szintillationszähler TriCarb 2500 TR, Packard, Frankfurt
- Szintillationszähler TriCarb 2300, Packard, Frankfurt
- Ultraschallbad Sonorex RK 106, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
- UltraTurrax, Jahnke und Kunkel, Staufen
- UV-Lampe, Quarzlampen GmbH, Hanau
- Vacuum Concentrator RCT 90, Jouan, Unterhaching
- Vortex-Rüttler, Heidolph, Kehlheim
- Waage PC 440 Delta Range, Mettler, Gießen

### **2.1.2     *Materialien***

- 10 ml Zentrifugengläser, Zinsser Analytik, Frankfurt
- Bond Elut C18 Extraktionssäulen, 500 mg, 3 ml, Varian, Darmstadt
- Dünnschicht-Chromatographieplatten, 20 × 20 cm, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt
- Einmal-Injektions-Kanülen Sterican Größe 18, Braun, Melsungen
- Einmalspritzen 1 ml Injekt F, Braun, Melsungen
- Eppendorfcups 1,5 ml und 2 ml, Eppendorf, Hamburg
- Filter No. 520 B II½, Schleicher und Schuell, Dassel
- Filter No. 602 H II½, Schleicher und Schuell, Dassel
- Isolute Kieselgel Extraktionssäulen, 5 g, 25 ml, IST, Grenzach-Wyhlen
- Kimwipe Papiertücher, Kimberly-Clark, Zefa, München
- Konische Einsätze für Qualyvials, 0,1 ml mit Federhalterung, Chrompack, Frankfurt
- Lebensmittel:
  - Hirse, H. & J. Brüggem, Lübeck

H-Vollmilch 3,5% Fettgehalt, Milfina, Neuburger Milchwerk, Neuburg a. d. Donau  
Kakaopulver, Trumpf Schokoladefabrik GmbH, Aachen  
Kochbeutelreis, Halfing GmbH, Halfing  
Mais für Polenta, Horst Küper GmbH, Oberhausen  
Popcornmais, Theodor Kattus GmbH, Maisach  
Sahne, 30% Fettgehalt, Milfina, Naabtaler Milchwerk, Schwarzenfeld  
Weizenmehl, A. Mühlischlegel GmbH Mühlenwerke, Thannhausen  
Äpfel, Ananas, Bananen, Blattspinat, Gurken, Karotten, Kartoffeln, Kiwi,  
Mandarinen, Salat, Tomaten, Weintrauben, Zitronen und Zwiebeln wurden am Tag  
der Analyse in Supermärkten gekauft

- Maxivials, Packard, Frankfurt
- Microvials 300 µl aus Polypropylen für die HPLC, Alltech, Unterhaching
- Nanosep MF Filter, Pall, Dreieich
- Neutralit pH-Indikatorpapier pH 5,5-9,0, Merck, Darmstadt
- Pasteurpipetten aus Glas zum Einmalgebrauch, Brand, Wertheim/Main
- Qualyvials, 1,5 ml mit Schraubverschluß und Silikon-Teflon-Septum, Zinsser Analytik, Frankfurt
- Wolframfilamente, SMS-Service für Massenspektrometrie GmbH, Idstein
- Schleifpapier Micromesh 6.000/8“ und 12.000/8“, 20,3 x 15,4 cm, Micro Surface Finishing Products Inc., Wilton, IO, USA
- Schraubgläser 1,5 ml für die HPLC, Chromatographie Müller, Fridolfing
- Trockenfutter ssniff R, ssniff Spezialdiäten, Soest
- Trockenfutter ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten, Soest
- Ultrafree Gefäße 0,22 µm, Millipore, Molsheim, Frankreich
- Vollpipetten aus Glas, 10 ml und 20 ml, Brand, Wertheim/Main

### **2.1.3 Reagenzien**

- Aceton p.A., Merck, Darmstadt
- Acetonitril HPLC Grad, Merck, Darmstadt
- Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt
- Ammoniumhydroxid 4,96 N wäßrige Lösung, Sigma, Deisenhofen
- Anabasin, TRC, Toronto, Kanada
- Anatabin, TRC, Toronto, Kanada
- Butyrolacton, Sigma, Deisenhofen
- Calciumchlorid, Merck, Darmstadt



- Chloroform p. A., Merck, Darmstadt
- (–)-Cotinin, Sigma, Deisenhofen
- D<sub>4</sub>-Myosmin, TCR, Toronto, Kanada
- Dichlormethan p.A., Merck, Darmstadt
- Dimethylformamid, Merck, Darmstadt
- Dinatriumhydrogenphosphat p.A., Merck, Darmstadt
- Eisessig, Merck, Darmstadt
- Epichlorhydrin, Sigma, Deisenhofen
- Ethanol p.A., Merck, Darmstadt
- Florisil (Korngröße 0,150-0,250), Merck, Darmstadt
- H<sub>2</sub>O, Ampuwa, Fresenius AG, Bad Homburg
- Helium, 99,99% Reinheit als Trägergas, Linde AG, München
- Heptacosa-FC43 Referenzgas, Supelco, Deisenhofen
- Hexan p.A., Merck, Darmstadt
- Isotone Kochsalzlösung 0,9%, Braun, Melsungen
- Kaliumcarbonat, Merck, Darmstadt
- Kaliumcyanid, Merck, Darmstadt
- Kaliumhydrogenphosphat p.A., Merck, Darmstadt
- Kaliumhydroxid, Merck, Darmstadt
- Methanol p.A., Merck, Darmstadt
- Methyljodid, Merck, Darmstadt
- Millipore-Wasser: deionisiertes Wasser, nachfolgend gereinigt durch Reagent Water System, Millipore, Königstein
- Morpholin, Sigma, Deisenhofen
- Morpholinperchlorat, selbstsynthetisiert aus Morpholin und Perchlorsäure
- Natriumchlorid p.A., Merck, Darmstadt
- Natriumhydrid, Sigma, Deisenhofen
- Natriumhydrogensulfit, Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid Plätzchen p.A., Merck, Darmstadt
- Natriummethanolat, Merck, Darmstadt
- Natriumsulfat wasserfrei, reinst, Merck, Darmstadt
- (–)-Nikotinhydrogentartrat-Salz, Sigma, Deisenhofen
- Nikotinsäureethylester, Sigma, Deisenhofen
- N<sup>o</sup>-Nitrosoanabasin, TRC, Toronto, Kanada
- N<sup>o</sup>-Nitrosoanatabin, TRC, Toronto, Kanada

- *N*<sup>7</sup>-Nitrosonornikotin, TRC, Toronto, Kanada
- (–)-Nornikotin, Sigma, Deisenhofen
- *N*-Vinyl-2-pyrrolidinon, Sigma, Deisenhofen
- β-PEITC (β-Phenylethylisothiocyanat), Sigma, Deisenhofen
- Perchlorsäure, Sigma, Deisenhofen
- Phenyltrimethylammoniumtribromid, Sigma, Deisenhofen
- 3-Pyridylessigsäure 70% p.A., Sigma, Deisenhofen
- Salzsäure konz. p.A., Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure rauchend p.A., Merck, Darmstadt
- Szintillationscocktail für die HPLC: Quickszint Flow 302, Zinsser Analytic, Frankfurt
- Szintillationscocktail für Messung am Szintillationszähler TriCarb 2500 TR: Ultima Gold XR, Packard, Frankfurt
- Szintillationscocktail für Messung am Szintillationszähler TriCarb 2300: Omni Szintisol, Merck, Darmstadt
- Toluol p.A., Merck, Darmstadt
- 1,1,1-Triethoxyethan, Sigma, Deisenhofen
- Triethylamin, Sigma, Deisenhofen
- Wasserstoffperoxid p.A., Merck, Darmstadt

#### 2.1.4 *Radiochemikalien*

- [5-<sup>3</sup>H]-Myosmin, spez. Aktivität 24 Ci/mmol, gelöst in Ethanol, Hartmann Analytik, Braunschweig
- [Carboxyl-<sup>14</sup>C]-Nikotinsäure, spez. Aktivität 50 mCi/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig
- [5-<sup>3</sup>H]-NNN, spez. Aktivität 20 Ci/mmol, gelöst in Ethanol, Hartmann Analytik, Braunschweig

#### 2.1.5 *Puffer und Lösungen*

- Ammoniumacetatpuffer 15 mM 1,15 g Ammoniumacetat werden in 1 l Millipore Wasser gelöst.
- D<sub>4</sub>-Myosmin-Stammlösung 7,7 mg D<sub>4</sub>-Myosmin werden in 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Aufbewahrung bei –20 °C.
- D<sub>4</sub>-Myosmin-Standardlösungen Aus der D<sub>4</sub>-Myosmin-Stammlösung wird 1 ml mit 9 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt. Aus dieser Verdünnung werden jeweils 350 µl in 1,5 ml-Qualyvials portioniert und zur Trockne eingedampft,

Aufbewahrung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Stoffmenge pro Gefäß:  $2,695\text{ }\mu\text{g}$ ).

- Phosphatpuffer pH 7,0

Eine  $0,2\text{ M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung wurde vorgelegt und mit einer  $0,2\text{ M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung auf pH 7,0 am Digital-pH-Meter eingestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Synthesen

#### 2.2.1.1 Myosmin, 3-(1-Pyrrolin-2-yl)pyridin

Zu einer Lösung von Natriumhydrid ( $0,26\text{ mol}$ ,  $10,4\text{ g}$  einer 60%igen Mineralöldispersion) in wasserfreiem Toluol ( $100\text{ ml}$ ) werden Nikotinsäureethylester ( $0,18\text{ mol}$ ) und N-Vinylpyrrolidon ( $0,18\text{ mol}$ ) tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wird  $2,5\text{ h}$  unter Rückfluß erhitzt und anschließend mit  $280\text{ ml}$  einer Mischung aus Wasser und konzentrierter Salzsäure 50/90 versetzt. Mit  $10\text{ N}$   $\text{NaOH}$  wird ein pH von 4 eingestellt und die Toluol-Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wird mit  $3 \times 100\text{ ml}$   $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  3/2 extrahiert und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand mit  $250\text{ ml}$  konzentrierter Salzsäure versetzt und  $16\text{ h}$  unter Rückfluß erhitzt. Man erhält reines karamellfarbenes Myosmin nach Vakuumdestillation (Brandänge und Lindblom, 1976).

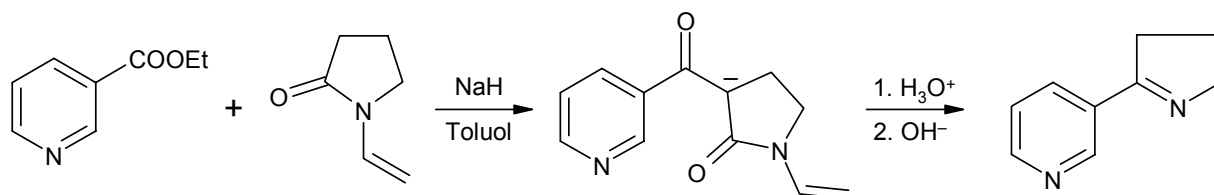
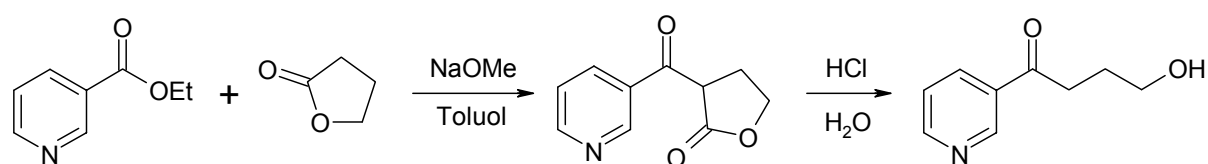


Abbildung 2-1: Synthese von Myosmin

#### 2.2.1.2 HPB, 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon

In einem  $250\text{ ml}$  Rundkolben mit KPG-Rührer werden  $186\text{ mmol}$  Natriummethanolat in  $50\text{ ml}$  wasserfreiem Toluol vorgelegt.  $131\text{ mmol}$  Butyrolacton und  $131\text{ mmol}$  Nikotinsäureethylester werden gemischt und langsam unter Rühren zugetropft. Die anfängliche rote Färbung wechselt nach wenigen Minuten nach beige. Der Ansatz wird  $1\text{ h}$  bei RT weitergerührt. Es werden  $25\text{ ml}$  wasserfreies Toluol,  $100\text{ ml}$  Wasser und  $80\text{ ml}$  Eisessig zugesetzt. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und die organische Phase erneut mit der Wasser/Eisessig-Mischung extrahiert. Die wäßrigen Phasen werden vereinigt und mit  $4 \times$

100 ml  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird das Trockenmittel abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es bleibt eine gelbe Lösung zurück, die in einen 1000 ml Rundkolben überführt und mit 250 ml konz. Salzsäure versetzt wird. Nach 3 h Rühren wird der pH-Wert der Lösung unter Eiskühlung mit NaOH-Plättchen und 8 N NaOH-Lösung auf 8 eingestellt. Die Lösung wird mit  $4 \times 100$  ml  $\text{CHCl}_3$  extrahiert, welches nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  am Rotationsverdampfer abgezogen wird. Die Aufreinigung des Rückstands erfolgt über Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat ( $R_f$  0,18). Man erhält eine wachsartige, hellgelbe Substanz (Hecht et al., 1977).



**Abbildung 2-2: Synthese von HPB**

#### *Identifizierung des Hauptnebenprodukts der HPB-Synthese*

Nach Auftrennen des Produktgemisches mittels Dünnschichtchromatographie wurde der Spot mit  $R_f$  0,54 von der Platte entfernt, mit  $\text{CHCl}_3$  extrahiert und mit GC/MS-System 3 (70 eV) untersucht. Die Trennung erfolgte an einer CS Supreme-5 Trennsäule von 25 m Länge. Die Probe wurde in  $\text{CHCl}_3$  eingespritzt. Der Temperaturgradient startete bei 50 °C (3 min isotherm), stieg mit 25 °C/min auf 300 °C und blieb 4 min bei dieser Temperatur. Als Trägergas kam Helium bei einer Flußrate von 1,5 ml/min zum Einsatz. Die Temperaturen von Einspritzblock und Transferline betrugen jeweils 300 °C.

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen wurden mit einem Bruker ARX 300 (300,13 bzw. 75,47 MHz) durchgeführt. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Die Angabe der chemischen Verschiebung  $\delta$  erfolgt in ppm. Die Signalmultiplizität wird wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Die Proben wurden in  $\text{CDCl}_3$  gelöst.

#### *2.2.1.3 Ketosäure, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäure*

Zu einer Suspension von NaH (375 mmol, 16,5 g einer 60%igen Mineralöldispersion) in 100 ml siedendem Toluol werden 750 mmol Nikotinsäureethylester gegeben. Nach Zusatz von 2,5 ml Ethanol werden 375 mmol Diethylsuccinat über 30 min zur siedenden Lösung zugetropft, danach 15 min weiter erhitzt und anschließend im Eisbad abkühlen lassen. Unter Rühren werden 250 ml 5 N HCl langsam zugegeben und die Lösung 10 min weitergerührt. Die

wäßrige Phase wird abgetrennt und mit 100 ml Toluol gewaschen. Nach Einstellen von pH 9 mit gekühlter, konzentrierter  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung wird mit  $3 \times 250$  ml  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer zu einem dunkelbraunen Öl eingengt. Das vorliegende Gemisch aus Nikotinsäureethylester und Diethyl- $\alpha$ -nikotinylsuccinat wird mittels Claisen-Destillation getrennt. Bei einer Ölbadtemperatur von  $120^\circ\text{C}$  geht zunächst Nikotinsäureethylester über, wogegen man Diethyl- $\alpha$ -nikotinylsuccinat erst bei einer Ölbadtemperatur von  $190^\circ\text{C}$  als Reinsubstanz mit einer Ausbeute von 64 g (229 mmol; 61,1% basierend auf eingesetztem Diethylsuccinat) erhält.

229 mmol Diethyl- $\alpha$ -nikotinylsuccinat werden in 150 ml 5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aufgenommen und 36 h unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird so lange mit NaOH auf pH 4-5 eingestellt, bis sich kein Niederschlag mehr bildet. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit  $2 \times 15$  ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und getrocknet (McKennis et al., 1964b).

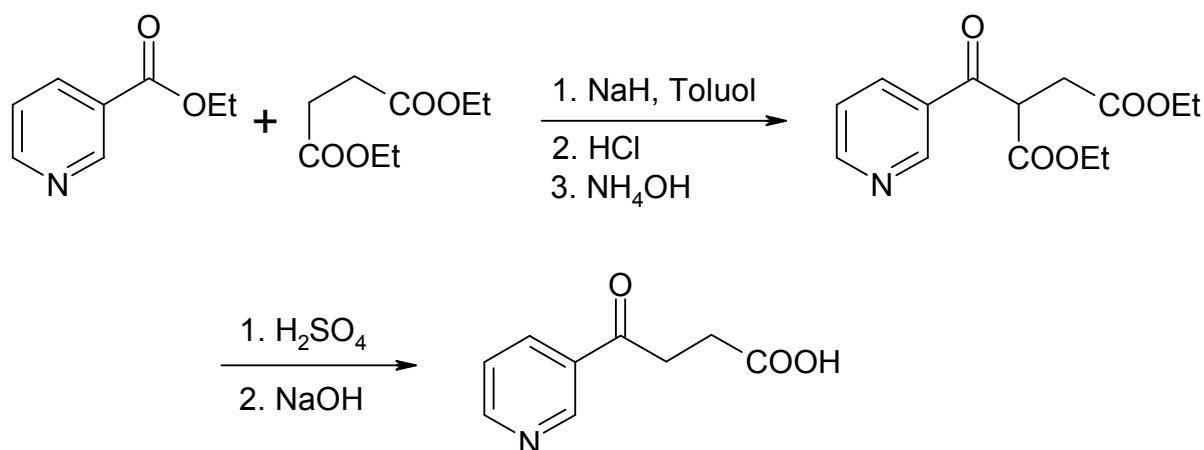


Abbildung 2-3: Synthese von Ketosäure

#### 2.2.1.4 Ketosäuremethylester, 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butansäuremethylester

0,015 mmol Ketosäure werden in 5 ml Aceton gelöst. Nach Zugabe von Kaliumcarbonat (0,04 mmol) wird die Lösung 10 min bei RT gerührt. 0,04 mmol Methyljodid werden zugesetzt und 4 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mittels GC/MS analysiert (Zwickenpflug et al., 2004).

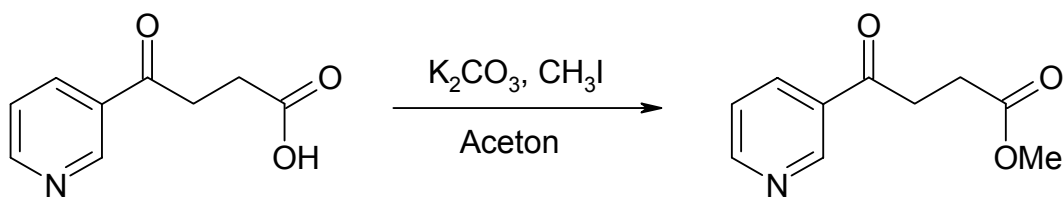


Abbildung 2-4: Synthese von Ketosäuremethylester

#### 2.2.1.5 3-Pyridylelessigsäuremethylester

Zu einer Lösung von 3-Pyridylelessigsäure (0,01 mmol) in 5 ml Aceton werden 0,03 mmol Kaliumcarbonat gegeben und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wird Methyljodid (0,03 mmol) zugesetzt und 3 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen des Acetons am Rotationsverdampfer wird der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mittels GC/MS analysiert (Zwickenpflug et al., 2004).

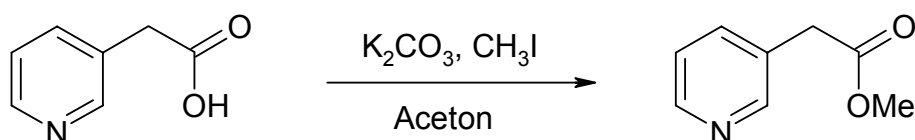


Abbildung 2-5: Synthese von 3-Pyridylelessigsäuremethylester

#### 2.2.1.6 3'-Hydroxymyosmin

Zu 3,42 mmol Myosmin in 20 ml wasserfreiem THF werden unter Eiskühlung 5,69 mmol Phenyltrimethylammoniumtribromid in 15 ml wasserfreiem THF zugetropft. Die orange Lösung wird 4 h bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe einer K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (2,15 g in 10 ml H<sub>2</sub>O) wird die Lösung mit 100 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und 2/3 des Volumens am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach Zugabe von 20 ml Eisessig wird das restliche CHCl<sub>3</sub> entfernt. Dem essigsauren Rückstand werden bei RT unter Rühren 2,58 mmol Silberacetat zugesetzt. Die Lösung wird 2 h unter Rückfluß erhitzt, abkühlen lassen und mit 10 N NaOH auf pH 12 eingestellt. Anschließend wird mit 3 × 50 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 85/15/2 aufgereinigt (R<sub>f</sub> 0,46) (Hecht et al., 1980b).

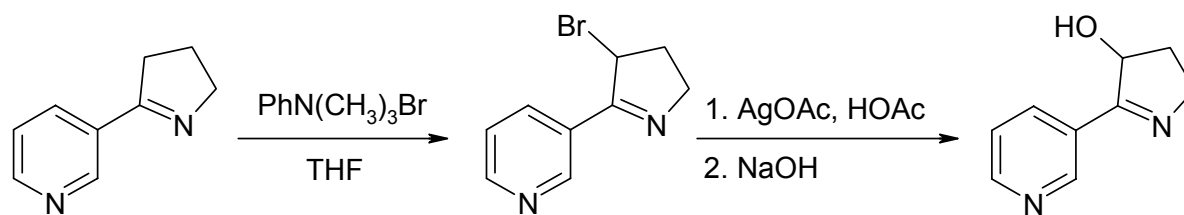


Abbildung 2-6: Synthese von 3'-Hydroxymyosmin

#### 2.2.1.7 4'-Hydroxymyosmin

Für die Synthese von 4'-Hydroxymyosmin wird Morpholinperchlorat benötigt, welches nicht kommerziell erhältlich ist und daher durch Zugabe von Perchlorsäure zu Morpholin unter Eiskühlung synthetisiert wurde. Der Niederschlag wurde abfiltriert und auf einem Filterpapier getrocknet.

7,89 mmol Morpholinperchlorat und 7,20 mmol Pyridin-3-aldehyd werden in 7 ml Morpholin gelöst und 1 h bei 80 °C erhitzt. Nach Zugabe von 7,68 mmol NaCN (in einem minimalen Vol. H<sub>2</sub>O gelöst) wird die Reaktionslösung 1 h bei 100 °C erhitzt. Die erkaltete Lösung wird mit 5 ml einer 10%igen K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und mit 4 × 5 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die Chloroform-Phase wird mit NaHSO<sub>3</sub> gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der ölige Rückstand wird in 25 ml DMF aufgenommen und nach Zugabe von 1,5 ml einer methanolischen 30%igen KOH-Lösung 20 min bei RT gerührt. Es werden 5 ml Epichlorhydrin (61,05 mmol) zugesetzt und die Lösung 65 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 25 ml H<sub>2</sub>O gestoppt und der Ansatz mit 5 × 25 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Der Chloroform-Extrakt wird mit 5 × 40 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zu einem öligen Rückstand eingeeengt, der anschließend in 20 ml NH<sub>4</sub>OH aufgenommen und mit einem NaOH-Plätzchen versetzt wird. Die Lösung wird 5 h bei 40 °C erwärmt, im Anschluß mit NaCl gesättigt und mit 3 × 25 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Der Extrakt wird mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der gelbe, ölige Rückstand wird an Florisil (20 g) aufgereinigt. Die Elution erfolgt fraktioniert mit folgenden Lösungsmittel-Mischungen: CHCl<sub>3</sub>, 1% MeOH in CHCl<sub>3</sub>, 5% MeOH in CHCl<sub>3</sub> und 10% in CHCl<sub>3</sub>. Letztere Fraktion wird eingeeengt und mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 85/15/2 erneut gereinigt (R<sub>f</sub> 0,4). Bleibt die Platte an der Luft bei RT stehen, so verfärbt sich der Spot aufgrund Dehydratisierung rasch orange (Leete et al., 1972; Hecht et al., 1980b).

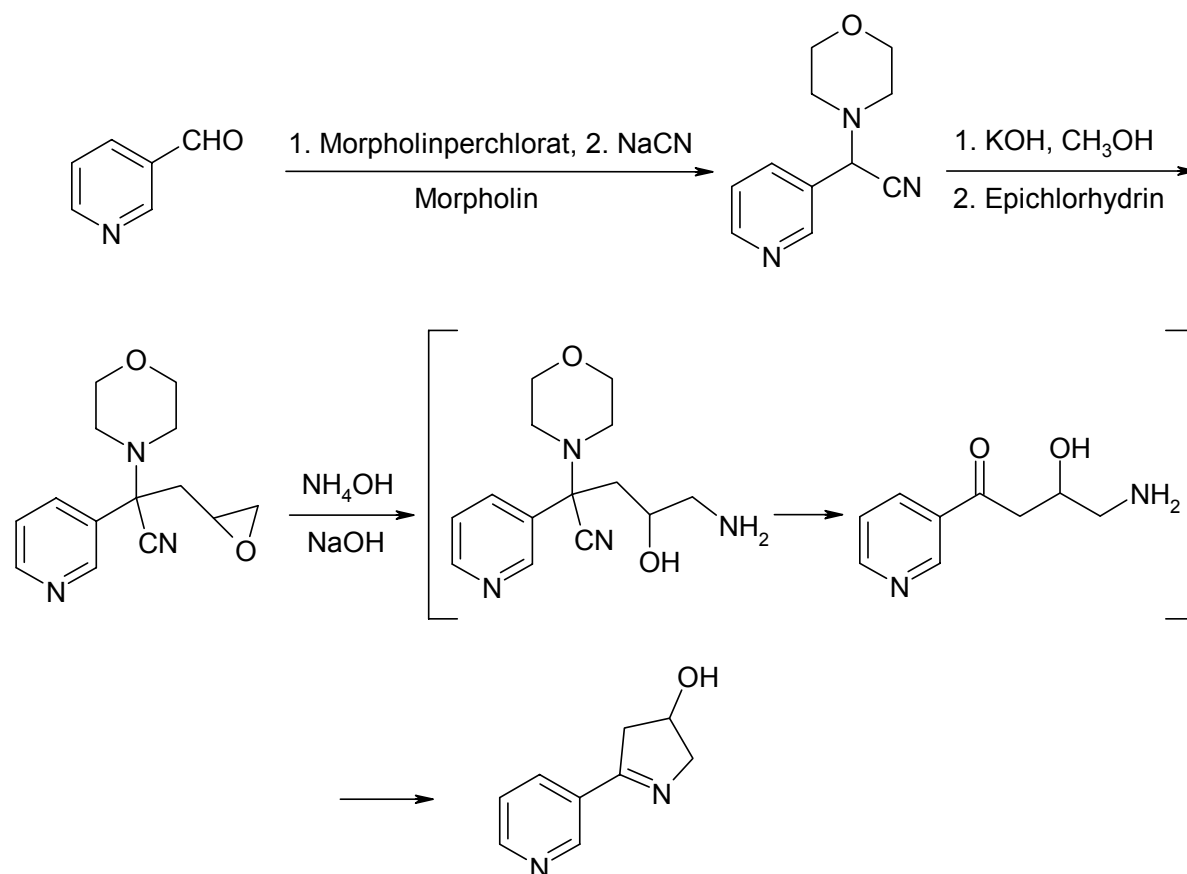


Abbildung 2-7: Synthese von 4'-Hydroxymyosmin

#### 2.2.1.8 <sup>14</sup>C-markiertes Myosmin, [2'-<sup>14</sup>C]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridin

##### Synthese

[Carboxyl-<sup>14</sup>C]-Nikotinsäure (0,02 mmol, 900 µCi) und 1,1,1-Triethoxyethan (0,04 mmol) werden in 200 µl wasserfreiem Toluol gelöst und 16 h bei 130 °C unter Rückfluß erhitzt. Zur abgekühlten Lösung werden 0,037 mmol *N*-Vinyl-2-pyrrolidon in 10 µl wasserfreiem Toluol und eine Lösung von Natriumhydrid (0,26 mmol, 10 mg einer 60%igen Mineralöldispersion) in 150 µl wasserfreiem Toluol tropfenweise zugesetzt. Die Lösung wird 2,5 h unter Rückfluß erhitzt (130 °C), anschließend mit 90 µl einer Mischung Wasser/konzentrierte Salzsäure 2/1 versetzt und 15 min bei RT gerührt. Mit 3 N NaOH wird ein pH von 4 eingestellt und die Toluol-Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wird mit 3 × 750 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3/2 extrahiert und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 300 µl konzentrierter Salzsäure aufgenommen und 16 h unter Rückfluß erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird auf pH 11 eingestellt und mit 3 × 750 µl CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Anschließend wird ein Großteil des Lösungsmittels entfernt und das



aufkonzentrierte Reaktionsgemisch an Kieselgel (Isolute SPE Säule, 5 g, 25 ml) mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9/1 aufgetrennt (Tyroller et al., 2003).

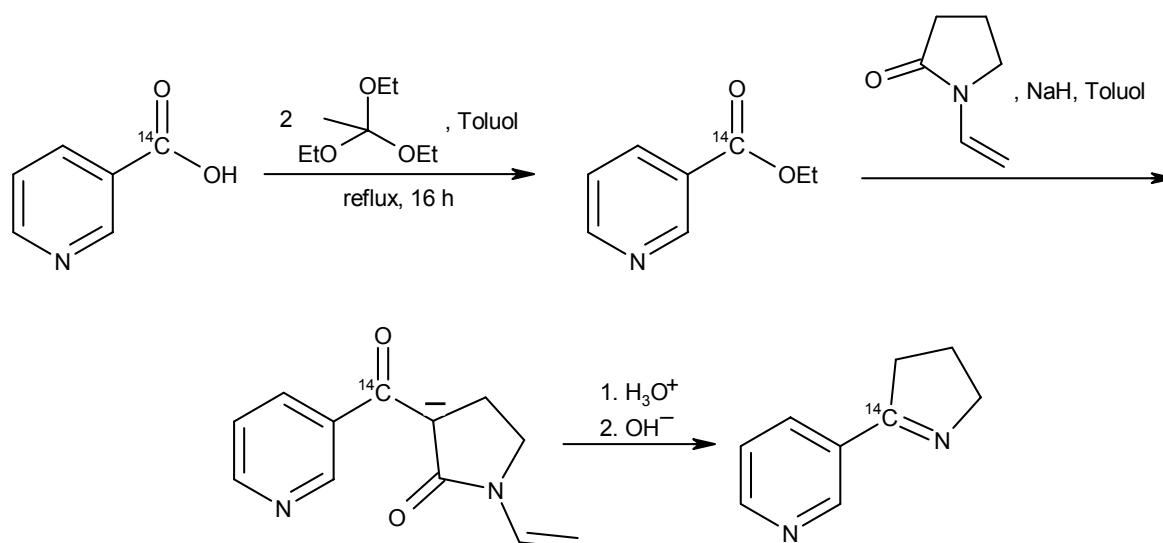
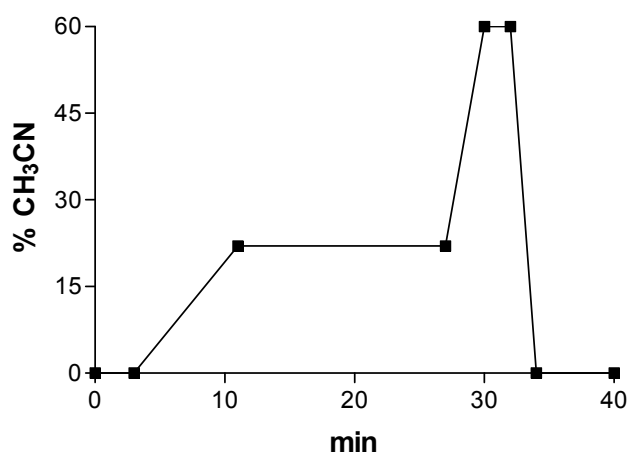


Abbildung 2-8: Synthese von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Myosmin

#### Identifizierung des Produkts

Das Reaktionsprodukt wurde mittels radio-HPLC (System 3) durch Retentionszeitvergleich mit unmarkiertem Myosmin sowie durch LC/MS (Finnigan LCQ, Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen) identifiziert. Die HPLC-Trennung erfolgte an LiChrospher100 RP-18e bei einer Flußrate von 0,7 ml/min mit Acetonitril und 15 mM Ammoniumacetatpuffer als Laufmittelkomponenten. Das Verhältnis der beiden Laufmittel wurde durch ein Gradientenprogramm wie folgt verändert:

- 3 min bei 0%  $\text{CH}_3\text{CN}/100\%$  Puffer
- in 8 min auf 22%  $\text{CH}_3\text{CN}/78\%$  Puffer
- 16 min bei 22%  $\text{CH}_3\text{CN}/78\%$  Puffer halten.
- in 2 min auf 60%  $\text{CH}_3\text{CN}/40\%$  Puffer
- 2 min halten
- in 2 min auf 0%  $\text{CH}_3\text{CN}/100\%$  Puffer



### *Bestimmung der radiochemischen Reinheit*

Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurde das oben beschriebene radio-HPLC-System verwendet. Die radiochemische Reinheit erhielt man nach Integration aller Signale im Radiochromatogramm.

### *Messung der Radioaktivität*

Aliquots von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Myosmin wurden mit 10 ml Omni Szintisol vermischt und am TriCarb 2300 Szintillationszähler vermessen.

### *Bestimmung der spezifischen Radioaktivität*

Die Flächenverhältnisse von markiertem und nicht markiertem Myosmin aus LC/MS Messungen wurden mit den Ergebnissen aus Szintillationsmessungen gleicher Aliquots wie für die LC/MS-Analyse verrechnet.

## **2.2.2 Nachweis von Myosmin in Lebensmitteln**

### *2.2.2.1 Auswahl des Probenmaterials*

Das Ziel der Probenauswahl war es, exemplarische Vertreter aus verschiedenen Gruppen von Lebensmitteln zu untersuchen. Es sollte keine Marktübersicht bestimmter Lebensmittel erstellt werden. Die Palette der Lebensmittel umfasst daher sowohl verschiedene Arten von Grundnahrungsmitteln, als auch diverse Obst- und Gemüsesorten. Ergänzt wurde die Übersicht durch eine Auswahl von Genussmitteln und Milchprodukten. Im einzelnen wurden folgende Produkte für die Analyse ausgewählt:

- Grundnahrungsmittel:  
Weizenmehl (Type 405), Reis (geschält, im Kochbeutel), Maismehl (u.a. für die Zubereitung von Polenta), Hirse, Kartoffeln
- Gemüse:  
Tomaten, Karotten, Salat, Blattspinat, Gurken, Zwiebeln
- Obst:  
Äpfel, Ananas, Kiwi, Weintrauben, Bananen, Mandarinen, Zitronen
- Genußmittel:  
Popcornmais, Kakaopulver
- Milchprodukte  
H-Vollmilch (3,5% Fettgehalt), Sahne (30% Fettgehalt)

Alle Lebensmittel wurden in Münchner Discount-Märkten gekauft und am gleichen Tag mit der Analyse begonnen.

#### 2.2.2.2 *Probenvorbereitung*

Um Unterschiede bei Verwendung von Proben mit verschiedener Chargennummer zu vermeiden, wurden Pools angelegt, aus denen schließlich Aliquots für die Probenaufarbeitung entnommen wurden. Alle Gemüse- und Obstproben wurden vor der Verwendung gründlich mit lauwarmem Wasser abgewaschen. Alle Proben mit Ausnahme von Reis (roh und gekocht) und Kartoffeln (gekocht) wurden in rohem Zustand untersucht. Aliquots von 50-60 g wurden mittels einer Labormühle oder mit dem UltraTurrax zerkleinert. Die Schale von Kartoffeln (nach dem Kochen), Äpfeln, Kiwis, Ananas, Gurken, Bananen, Mandarinen und Zitronen wurde entfernt und separat analysiert.

#### 2.2.2.3 *Probenaufarbeitung*

Zu 50-60 g der vorbereiteten Proben wurden 10 ml 6 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 40  $\mu\text{l}$  (308 ng) einer  $\text{D}_4$ -Myosmin-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gegeben (Für die Zugabe des internen Standards werden 350  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in das 1,5 ml-Qualyvial mit dem aliquotierten  $\text{D}_4$ -Myosmin-Standard gegeben). Nach 16 h rühren wurden die Proben 3 min in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend bei 1800 g für 10 min zentrifugiert (Minifuge GL). Der Überstand wurde in einen Erlenmeyer-Kolben überführt und der Rückstand in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, filtriert (Schleicher und Schuell No. 520 B II½) und das Filtrat mit dem Überstand vereinigt. Nach Einstellen von pH 7 mit 6 N NaOH wurden die Proben erneut für 10 min bei 1800 g zentrifugiert (Minifuge GL). Zunächst wurde der Überstand filtriert (Schleicher und Schuell No. 602 H½), der Rückstand in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und ebenfalls über den Filter gegeben. Das Filtrat wurde nochmals über einen Filter des gleichen Typs gegeben bevor der pH-Wert der Lösung auf 7 eingestellt wurde. Anschließend wurden die Proben über vorher mit 6 ml MeOH und 6 ml  $\text{H}_2\text{O}$  konditionierte SPE-Säulen ( $\text{C}_{18}$ , 500 mg, 3 ml) gegeben, welche nach der Aufgabe mit 9 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen wurden. Die Säulen wurden durch Zentrifugieren bei 2200 g getrocknet und mit  $4 \times 500 \mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3$  eluiert. Die Proben wurden bei RT eingengt und der Rückstand in 70  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  für die GC/MS-Analyse aufgenommen.

#### 2.2.2.4 Qualitativer Nachweis mittels GC/MS

##### *Geräteparameter*

Für die qualitative Analyse von Myosmin wurde ein System bestehend aus einem Gaschromatographen HP 5890 series II und einem Massenspektrometer HP 5972 der Firma Hewlett Packard verwendet. Die Trennung erfolgte an einer DB-5 Säule ( $2 \times 30$  m 0,2 mm I.D., 0,33  $\mu$ m Filmdicke) mit Helium als Trägergas bei einem Ausgangsdruck von 2 bar (80 °C) und einer Flußrate von 0,674 ml/min. Die Temperaturen von Einspritzblock und der Verbindungsleitung vom GC zum MS betrugen 280 °C bzw. 300 °C.

Für die Gaschromatographie zur qualitativen Bestimmung von Myosmin wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

- 1 min bei 80 °C halten
- mit 15 °C/min auf 325 °C heizen
- 5 min bei 325 °C halten.

Die Analysen wurden im splitless Modus durchgeführt wobei das Rückdruckventil für 1 min geschlossen blieb.

Der Nachweis von Myosmin erfolgte über die Massenspektrometrie. Die Ionisierung der Moleküle erfolgte durch Elektronenstoßionisation bei 70 eV und einer Quellentemperatur von 180 °C. Die ionisierten Teilchen wurden durch einen Quadrupol analysiert.

##### *Messung*

Es wurden jeweils 1  $\mu$ l der Probenlösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  eingespritzt. Zur Identifizierung der enthaltenen Verbindungen verwendete man den Scan-Modus. Dazu wurde ein Bereich von 50 bis 200 amu gewählt. Aufgrund der erhöhten Nachweisempfindlichkeit wurde im folgenden der Single Ion Monitoring (SIM) Modus genutzt. Dabei wurden nur die für Myosmin charakteristischen Ionen mit den Massen  $m/z$  146, 118, 105, 78, 51 bestimmt. Alle Ionen wurden mit einer dwell time von 100 ms bei 1,72 cycles/s gemessen.

#### 2.2.2.5 Quantitativer Nachweis mittels GC/MS

##### *Geräteparameter*

Quantitative Analysen von Myosmin wurden mit einem System der Firma Fisons Instruments, bestehend aus einem Gaschromatographen Fisons 8060 und einem Quadrupol Massenspektrometer TRIO 1000 durchgeführt. Zur Trennung wurde eine ZB 50 Säule (30 m,

0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke) mit Helium als Trägergas bei einer Flußrate von 0,674 ml/min verwendet. Die Temperaturen von Einspritzblock und der Verbindungsleitung vom GC zum MS betrugen 200 °C bzw. 300 °C.

Für die Gaschromatographie zur quantitativen Bestimmung von Myosmin wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

- 1 min bei 80 °C halten
- mit 15 °C/min auf 310 °C heizen
- 5 min bei 310 °C halten.

Die Analysen wurden im splitless Modus durchgeführt, wobei das Rückdruckventil für 1 min geschlossen blieb.

Der Nachweis von Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin erfolgte mittels Massenspektrometrie. Die Ionisierung der Moleküle erfolgte durch Elektronenstoßionisation bei 70 eV und bei einer Quellentemperatur von 250 °C.

### *Messung*

Die zu untersuchenden Probenlösungen enthielten zusätzlich D<sub>4</sub>-Myosmin als internen Standard. Es wurden jeweils 1 µl der Lösung in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> eingespritzt. Zur Identifizierung der enthaltenen Verbindungen verwendete man den Scan-Modus im Massenbereich von 50 bis 200 amu. Aufgrund der erhöhten Nachweisempfindlichkeit wurde für die Quantifizierung der SIM-Modus genutzt. Dabei wurden nur die für Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin charakteristischen Ionen mit den Massen  $m/z$  146, 118, 105, 78, 51 bzw. 150 und 122 bestimmt. Alle Ionen wurden mit einer dwell time von 100 ms vermessen.

### *Erstellung der Kalibrierkurven und Bestimmung der Nachweisgrenzen*

Es wurden Kalibrierkurven der Substanzen Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin durch Vermessen von Verdünnungsreihen erstellt. Dazu wurden Stammlösungen der beiden Verbindungen mit 5 mg in 50 ml Dichlormethan hergestellt. Aus dieser Lösung wurden je zwei Verdünnungen hergestellt. So wurden 10 µl der Stammlösung einmal mit 9990 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Verdünnung 1) und einmal mit 990 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Verdünnung 2) verdünnt. Entsprechende Volumina dieser beiden Verdünnungen werden auf 100 µl aufgefüllt und 1 µl eingespritzt. Ein Pipettierschema für Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin ist der Tabelle 2-1 zu entnehmen.

**Tabelle 2-1: Pipettierschema für die Kalibrierkurven von Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

Volumen Verdünnung 1 [μl]	Volumen Verdünnung 2 [μl]	Endvolumen [μl]	Einspritzvolumen [μl]	pg on column
0	0	100	1	0
10		100	1	10
25		100	1	25
50		100	1	50
100		100	1	100
	25	100	1	250
	50	100	1	500
	100	100	1	1000

*Bestimmung der Wiederfindung*

Wiederfindungsraten wurden durch Zusatz von <sup>3</sup>H-markiertem Myosmin bestimmt. Dazu wurden vier Proben mit Maismehl jeweils ca. 100000 dpm Radioaktivität zugesetzt und am Ende des Analysenganges ein Aliquot der CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösung für die GC/MS-Bestimmung nach Zugabe von 10 ml Flüssigszintillator Ultima Gold XR am Szintillationszähler TriCarb 2500 TR gemessen.

Um zu prüfen, ob sich der ermittelte Gesamtverlust an Analyten gleichmäßig auf die einzelnen Schritte des Analysengangs verteilt, oder ein Schritt mit einem besonders hohen Verlust einhergeht, wurden Aliquots nach jedem Analysenabschnitt entnommen und vermessen.

*Datenverarbeitung*

Die Daten der GC/MS-Messungen wurden mit der Software MassLab der Firma Fisons Instruments aufgezeichnet. Die Identifizierung der Analyten erfolgte anhand der Retentionszeit und der charakteristischen Massenfragmente. Die Integration der Signale geschah programmgestützt, jedoch musste die Auswertung einiger Peaks manuell überarbeitet werden.

*Berechnung des Myosmin-Gehalts*

Um die Myosmin-Menge in der Probe zu bestimmen, wurde die Fläche des entsprechenden Ions der Masse 118 durch die Fläche des internen Standards (*m/z* 122) geteilt und mit dem

Verhältnis der Molekulargewichte ( $M_{\text{MYO}}/M_{\text{D}_4\text{-MYO}}$ ) und der absoluten Menge des zugesetzten internen Standards multipliziert. Es resultierte der Wert für Myosmin in pg (Bryant et al., 1987). Es mussten keine Blindwerte subtrahiert werden, da keine anderen Substanzen zur entsprechenden Retentionszeit eluierten.

$$\frac{\text{Fläche}_{\text{MYO}}}{\text{Fläche}_{\text{D}_4\text{-MYO}}} \cdot \frac{M_{\text{MYO}}}{M_{\text{D}_4\text{-MYO}}} \cdot \text{absolute Menge}_{\text{D}_4\text{-MYO}}$$

### 2.2.3 Metabolismus von Myosmin in Wistar Ratten

#### 2.2.3.1 Versuchstiere und Tierversuch

Als Versuchstiere dienten weibliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 200-250 g (Harlan-Winkelmann, Borcheln). Die Ratten wurden zunächst in Stahlkäfigen zu je vier Tieren untergebracht. Die Haltung erfolgte bei einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 h bei 25 °C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit. Während der Akklimatisierung von mindestens einer Woche erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum (ssniff R, ssniff Spezialdiäten, Soest). Ein Tag vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfige umgesetzt und vier Gruppen zu je vier Tieren gebildet. Für 24 h erhielten die Tiere kein Futter, jedoch Wasser ad libitum.

Zur Bestimmung des dosisabhängigen Metabolismus sollte den Tieren Myosmin in den Dosierungen 0,001, 0,005, 0,5 und 50 µmol/kg Körpergewicht verabreicht werden. Diese Dosis setzte sich aus 2,81 ng (18,9 pmol)  $^3\text{H}$ -markiertem Myosmin und einer entsprechenden Menge nicht markierter Substanz zusammen. Hierzu wurde eine wässrige Myosmin-Stammlösung mit 50 mg/ml hergestellt. Eine erste Verdünnung aus 1 µl Stammlösung und 99 µl Wasser ergab eine Konzentration von 500 ng/µl. Eine zweite Verdünnung aus 1 µl Stammlösung und 999 µl Wasser entsprach 50 ng/µl.

**Tabelle 2-2 Verabreichte Mengen  $^3\text{H}$ -markiertes und nicht markiertes Myosmin**

MYO-Dosis [µmol]	$^3\text{H}$ -MYO/Tier [ng]	MYO/kg KG [µg]	MYO/250 g Tier		
			Stammlsg. [µl]	1. Verd. [µl]	2. Verd. [µl]
0,001	2,81	0,1459	—	—	0,73
0,005	2,81	0,7306	—	—	3,65
0,5	2,81	73,1	—	36,6	—
50	2,81	7310	36,6	—	—

Zur Verabreichung wurde ein präpariertes Apfelstück verwendet. Die Tiere wurden im Vorfeld darauf trainiert, dieses von einer Pinzette aufzunehmen und vollständig zu fressen. Um die Saugfähigkeit des Apfelstücks zu erhöhen, wurde es vor Aufträufeln der Myosmin-Lösungen mit einem Papiertuch abgetupft. Ein Tier der Gruppe mit der höchsten Dosis verweigerte die Aufnahme des Köders, so dass für diese Gruppe nur drei Versuchstiere ausgewertet werden konnten. Nach Verabreichung des Myosmins erhielten die Tiere wieder Futter und Wasser ad libitum.

Der Urin jedes Versuchstiers wurde jeweils nach 6, 24 und 48 h getrennt gesammelt, wogegen der Faeces jeweils 48 h gepoolt wurde. Alle Proben wurden direkt nach dem jeweiligen Versuchsabschnitt bei -21 °C gelagert, um ein eventuelles Abreagieren der Metaboliten bis zur HPLC-Analyse zu verhindern.

Zur Aufklärung der Myosmin-Metaboliten wurde vier Tieren jeweils 2 mg nicht markiertes Myosmin mittels Apfelstück verabreicht und der Urin über 24 h gesammelt.

#### 2.2.3.2 *Verteilung der Radioaktivität auf Urin und Faeces*

Durch Bestimmung der Radioaktivitätsmenge in Urin und Faeces konnten Rückschlüsse auf den bevorzugten Eliminationsweg von Myosmin gezogen werden. Dazu wurden von jeder Urinprobe drei 50 µl Aliquots mit je 10 ml Szintillationscocktail Ultima Gold XR versetzt und im Szintillationszähler Tri Carb 2500 TR vermessen.

Faecesproben wurden mit 2,5 ml Methanol/g Faeces vermischt und am UltraTurrax homogenisiert. Zu 0,1 g des Homogenats wurden 0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,2 ml HClO<sub>4</sub> gegeben und bei 80 °C für 30 min inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden 10 ml Szintillationscocktail Ultima Gold XR zugemischt und 12 h bei Dunkelheit gelagert. Die Messung erfolgte ebenfalls im Szintillationszähler Tri Carb 2500 TR.

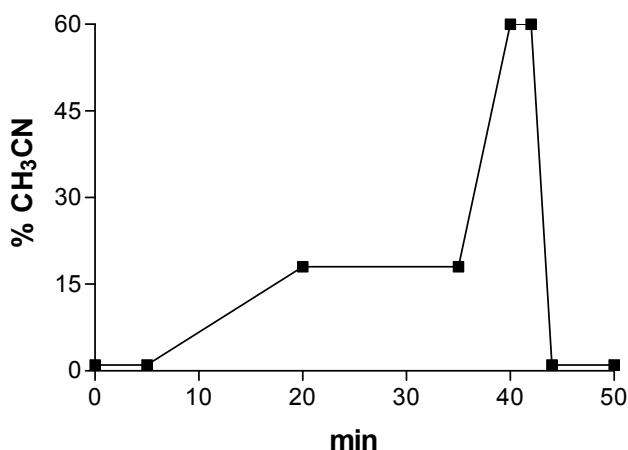
#### 2.2.3.3 *Bestimmung des Metabolitenspektrums im Urin*

Um unlösliche Bestandteile abzutrennen wurden Aliquots von 400 µl zunächst 5 min bei 2200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Filtereinsatz eines Nanosep MF Gefäßes mit einer Porenweite von 0,2 µm überführt und 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde in konische Probengefäße für die HPLC-Messung abgefüllt. Die chromatographische Trennung erfolgte mit HPLC-System 1 an einer LiChrospher 60 RP-18 SelectB 5µ Säule. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des online-Radioaktivitätsdetektors Ramona 2000 nach



Zumischung eines Flüssigszintillators Quickszint Flow 302 (3 ml/min) bestimmt. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril und 15 mM Ammoniumacetat-Puffer bei einer Flußrate von 0,7 ml/min, dessen Zusammensetzung durch folgendes Gradientenprogramm verändert wurde:

- 5 min bei 1% CH<sub>3</sub>CN/99% Puffer
- in 15 min auf 18% CH<sub>3</sub>CN/82% Puffer
- 15 min bei 18% CH<sub>3</sub>CN/82% Puffer halten.
- in 5 min auf 60% CH<sub>3</sub>CN/40% Puffer
- 2 min bei 60% CH<sub>3</sub>CN/40% Puffer halten
- in 2 min auf 1% CH<sub>3</sub>CN/99% Puffer



Die Radioaktivitätssignale wurden mit der Winnie-Software aufgezeichnet und ausgewertet, wobei die Flächen unter den Signalen nach Festlegung einer Basislinie automatisch integriert wurden.

#### 2.2.3.4 Identifizierung der Metaboliten

Für die Identifizierung der Metaboliten kamen HPLC-System 2 (LiChrospher 60 RP-18 SelectB 5 $\mu$  Säule und Laufbedingungen wie unter 2.2.3.3 beschrieben) und GC/MS-System 2 zum Einsatz. UV-Chromatogramme wurden bei den Wellenlängen 232 und 254 nm aufgezeichnet. Die Wellenlänge des Diodenarray-Detektors lag bei 270 nm mit einer Bandbreite von 140 nm (200-340 nm).

Rattenurin beinhaltet eine Vielzahl von Substanzen, die die UV-Detektion erheblich stören. Gerade die vielen hydrophilen Stoffe, die früh von der C18-Säule eluiert werden, überlagern eventuell vorhandene Myosmin-Metaboliten gänzlich. Daher war eine Isolierung der zu identifizierenden Substanzen dringend erforderlich. Dies geschah durch fraktionierte Elution von C18-Festphasenextraktionsröhrchen. Der zentrifugierte Urin wurde auf ein konditioniertes Säulchen aufgebracht und fraktioniert mit verschiedenen Mischungen CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (2/98; 4/96; 6/94; 8/92) eluiert. Die Eluate wurden anschließend für diverse Nachweisverfahren verwendet, wobei sich die später identifizierten Metaboliten selektiv

angereichert in den unterschiedlichen Fraktionen befanden. So konnten die Eluate sowohl für Retentionszeit- und UV-Spektrenvergleiche mit Standardsubstanzen unter HPLC-Bedingungen, als auch für Derivatisierungsreaktionen im Vorfeld von GC/MS-Analysen verwendet werden.

### *3-Pyridylelessigsäure und Ketosäure*

Diese beiden Metaboliten zeigten aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften als Säuren keine oder nur sehr schwache Wechselwirkungen mit dem C18-Material, so dass zu ihrem Nachweis sowohl die 2/98-Fraktion als auch der Anteil, der beim Aufbringen der Probe durch das Säulchen gelaufen ist, verwendet wurde. Die Proben wurden vereinigt und am Vacuum Concentrator RCT 90 eingengt. Die Derivatisierung erfolgte nach den unter 2.2.1.4 und 2.2.1.5 beschriebenen Bedingungen. Nach Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10/1 wurden die entsprechenden Spots, deren  $R_f$ -Wert im Vorfeld durch Versuche an Standardsubstanzen ermittelt wurde, von der Platte entfernt und mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3/2 extrahiert. Nach Einengen der Lösung erfolgte die GC/MS-Analyse nach den in 2.2.2.5 beschriebenen Bedingungen. Zum Nachweis der methylierten Ketosäure wurde der Scan-Modus im Massenbereich von 50 bis 200 amu gewählt. Dagegen ließ sich die methylierte 3-Pyridylelessigsäure im Scan-Modus nicht eindeutig identifizieren, so dass in den Single-Ion-Modus gewechselt wurde und nur die relevanten Molekülmassen  $m/z$  65, 92, 107 und 151 aufgezeichnet wurden.

Eine weitere Bestätigung lieferten HPLC-Retentionszeit- und Spektrenvergleiche mit den entsprechenden Standardsubstanzen (3-Pyridylelessigsäure käuflich erworben; Synthese von Ketosäure siehe 2.2.1.3).

### *HPB*

Zur Identifizierung des Ketoalkohols HPB wurde die Fraktion nach Elution mit 8%  $\text{CH}_3\text{CN}/92\% \text{H}_2\text{O}$  verwendet. Der Nachweis erfolgte mittels Co-Chromatographie der Standardsubstanz (Synthese siehe 2.2.1.2). Die Retentionszeiten und UV-Spektren wurden mit HPLC-System 2 erfasst.

### *3'-Hydroxymyosmin*

Dieser Metabolit konnte ebenfalls in der 8/92-Fraktion durch Co-Chromatographie mit der entsprechenden Standardsubstanz (Synthese siehe 2.2.1.6) identifiziert werden. Die Substanz

war aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen einer GC/MS-Analyse nicht zugänglich. Auf Derivatisierungsversuche wurde verzichtet und stattdessen auf LC/MS (ESI positiv) ausgewichen. Dazu wurde eine Agilent 1100 Series HPLC mit einem Sciex API 2000 Massenspektrometer kombiniert. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Methanol/Acetonitril/0,1%ige Ameisensäure 50/48/2 isokratisch bei einer Flußrate von 0,2 ml/min ohne Trennsäule verwendet. Bei einem Einspritzvolumen von 5 µl wird die Probe bei einer Spraykapillarenspannung von 5,5 kV und einer Heizkapillarentemperatur von 350 °C analysiert.

#### **2.2.4      *Untersuchungen zum Einfluss von Nikotin, Cotinin und PEITC auf den NNN-Metabolismus***

##### **2.2.4.1    *Versuchstiere und Tierversuch***

Männliche F344-Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von ca. 200-250 g dienten als Versuchstiere. Zur Akklimatisierung wurden jeweils vier Tiere in einen Stahlkäfig gesetzt und bei einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h, 25 °C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit mindestens sieben Tage gehalten. Die Ratten erhielten dabei Futter (ssniff R) und Wasser ad libitum. Am Tag vor Versuchsbeginn wurden die Ratten in vier Gruppen (Kontrolle, NIC, COT, PEITC) zu je acht Tieren eingeteilt und einzeln in Stoffwechselkäfige umgesetzt. Die Tiere erhielten Wasser und ssniff R/M-H Futter ad libitum. Dieses spezielle Futter ist gemahlen und eignet sich so zum Anteigen mit Wasser. Dadurch kann eine Verschleppung des Futters durch die Tiere aus dem Futtergang in den Käfigbereich effektiv verhindert und somit eine Kontamination von Urin und Faeces durch Futterbestandteile fast gänzlich ausgeschlossen werden.

Jedes Tier erhielt 30 nmol/kg KG (5,3 µg/kg KG) NNN ([5-<sup>3</sup>H]-NNN und nicht markiertes NNN), die Tiere der Gruppen NIC, COT und PEITC zusätzlich eine definierte Menge der entsprechenden Substanz (Tabelle 2-3). Um die Auswertbarkeit der Radiochromatogramme zu gewährleisten, sollte jedes Tier ca. 4 Mio dpm [5-<sup>3</sup>H]-NNN erhalten. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität entspricht dies lediglich ca. 16 ng der <sup>3</sup>H-markierten Substanz. Diese geringe Menge an markiertem NNN muss bei der Berechnung der NNN-Dosis aufgrund des hohen Anteils an nicht markiertem NNN (1,3 µg/250 g Tier) nicht berücksichtigt werden. NNN, Nikotin und Cotinin wurden einzeln in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und subcutan verabreicht. Die Konzentrationen der Lösungen wurden so gewählt, dass sich je Substanz ein zu applizierendes Volumen von ca. 100 µl/100 g KG ergab. PEITC wurde über das Futter mit einer Konzentration von 1 µmol/g Futter verabreicht. Die Fütterung der PEITC-

Gruppe wurde bereits 24 h vor Injektion der [5-<sup>3</sup>H]-NNN-Lösung begonnen und während des gesamten Versuchs fortgesetzt.

**Tabelle 2-3 Subcutan an F344 Ratten applizierte Substanzen**

Gruppe	NNN [nmol/kg KG]	Nikotin [μmol/kg KG]	Cotinin [μmol/kg KG]	PEITC [μmol/g Futter]
Kontrolle	30	—	—	—
NIC	30	15	—	—
COT	30	—	150	—
PEITC	30	—	—	1

Urinproben wurden nach 24 h und 48 h gewonnen. Urin der ersten 24 h wurde auf Eis gelagert, da dieser für die HPLC-Untersuchungen verwendet wurde und so ein eventueller mikrobieller Abbau und Abreaktion von Metaboliten unterbunden werden sollte. Faecesproben wurden nur während der ersten 24 h gesammelt. Die spätere Lagerung aller Proben erfolgte bei -21 °C.

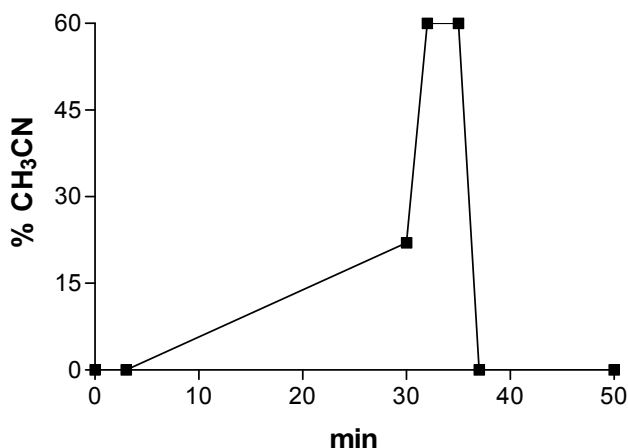
#### 2.2.4.2 Radioaktivitätsverteilung in Urin und Faeces

Die Radioaktivitätsmengen in Urin und Faeces wurden unter den in 2.2.3.2 beschriebenen Bedingungen bestimmt.

#### 2.2.4.3 Trennung der Urinmetaboliten

Aliquots von 700 μl Urin wurden zunächst 5 min bei 2200 g zentrifugiert um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in den Filtereinsatz eines Millipore Ultrafree Gefäßes mit einer Porenweite von 0,22 μm überführt und 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde in konische Probengefäße für die HPLC-Messung abgefüllt. Die Metaboliten wurden mit HPLC-System 1 an einer LiChrospher 60 RP-18 SelectB 5μ Säule aufgetrennt. Die Messung der Radioaktivität geschah on-line mit Hilfe des Radioaktivitätsdetektors Ramona 2000 nach Zumischung eines Flüssigszintillators Quickszint Flow 302 (2 ml/min). Das Fließmittel setzte sich aus Acetonitril und 10 mM Phosphat-Puffer zusammen. Bei einer Flußrate von 0,7 ml/min wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase durch folgendes Gradientenprogramm verändert:

- 3 min bei 0% CH<sub>3</sub>CN/100% Puffer
- in 27 min auf 22% CH<sub>3</sub>CN/78% Puffer
- in 2 min auf 60% CH<sub>3</sub>CN/40% Puffer
- 3 min bei 60% CH<sub>3</sub>CN/40% Puffer halten
- in 2 min auf 0% CH<sub>3</sub>CN/100% Puffer



Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Winnie-Software durch automatische Festlegung der Basislinie und anschließende Integration der Signalflächen.

#### 2.2.4.4 Identifizierung der Metaboliten im Urin

Da das Metabolitenspektrum von NNN bereits in den 1980er Jahren aufgeklärt wurde, konnte bei der Zuordnung der Radioaktivitätssignale auf aufwändige strukturelle Nachweise verzichtet werden. Alle potenziellen NNN-Metaboliten lagen als nicht radioaktiv markierte Referenzsubstanzen vor und konnten durch on-line UV-Messung bei den Wellenlängen 234 und 254 nm co-chromatographiert werden. Dadurch war eine eindeutige Zuordnung der radioaktiven Signale möglich.

### 2.2.5 Versuche zur Beeinflussung des NNN-Stoffwechsels durch Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, N'-Nitrosoanatabin und N'-Nitrosoanabasin

#### 2.2.5.1 Versuchstiere und Tierversuch

Als Versuchstiere dienten wiederum männliche F344-Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von ca. 200-250 g, die unter den in 2.2.4.1 beschriebenen Bedingungen gehalten wurden. 24 h vor Versuchsbeginn werden die Ratten in sieben Gruppen (Kontrolle, NRN, AT, AB, MYO, NAT, NAB) zu je vier Tieren eingeteilt und einzeln in Stoffwechselkäfige umgesetzt. Die Tiere erhielten für die Dauer des Versuchs Wasser und das mit Wasser angefeuchtete Futtermehl (ssniff R/M-H) ad libitum.

Am Versuchstag erhielt jedes Tier 30 nmol/kg KG (5,3 µg/kg KG) NNN ([5-<sup>3</sup>H]-NNN und nicht markiertes NNN), die Tiere der Gruppen NRN, AT, AB, MYO, NAT und NAB zusätzlich eine definierte Menge der entsprechenden Substanz (Tabelle 2-4). Um genügend

Radioaktivität für die Auswertung der Radiochromatogramme zur Verfügung zu stellen, sollte jedes Tier ca. 4 Mio dpm [ $^3\text{H}$ ]-NNN erhalten. Dies entspricht lediglich wenigen Nanogramm der  $^3\text{H}$ -markierten Substanz, so dass diese bei der Berechnung des nicht markierten NNN (1,3  $\mu\text{g}/250\text{ g Tier}$ ) nicht berücksichtigt werden muss. NNN ([ $^3\text{H}$ ]-NNN und nicht markiertes NNN), Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, *N'*-Nitrosoanatabin und *N'*-Nitrosoanabasin wurden einzeln in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und subcutan verabreicht. Die Konzentrationen der Lösungen wurden so gewählt, dass sich je Substanz ein zu applizierendes Volumen von ca. 100  $\mu\text{l}/100\text{ g KG}$  ergab.

**Tabelle 2-4**      **Übersicht der gleichzeitig an F344 Ratten verabreichten Substanzen**

Gruppe	NNN [nmol/ kg KG]	Nornikotin [ $\mu\text{mol}/$ kg KG]	Anatabin [ $\mu\text{mol}/$ kg KG]	Anabasin [ $\mu\text{mol}/$ kg KG]	Myosmin [ $\mu\text{mol}/$ kg KG]	<i>N'</i> -Nitroso- anatabin [nmol/ kg KG]	<i>N'</i> -Nitroso- anabasin [nmol/ kg KG]
Kontr.	30	—	—	—	—	—	—
NRN	30	15	—	—	—	—	—
AT	30	—	15	—	—	—	—
AB	30	—	—	15	—	—	—
MYO	30	—	—	—	3	—	—
NAT	30	—	—	—	—	300	—
NAB	30	—	—	—	—	—	300

Urin wurde in den Zeitabschnitten 0-12 h, 12-24 h, 24-48 h und 48-72 h gesammelt. Dabei wurden die Urinproben der ersten 12 h auf Eis gelagert, um die Metaboliten vor weiterem Abbau zu schützen. Faecesproben wurden über den Zeitraum von 72 h gepoolt. Die spätere Lagerung der gewonnenen Proben erfolgte bei  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.5.2      *Quantifizierung der ausgeschiedenen Radioaktivität in Urin und Faeces*

Messungen der Radioaktivitätsmengen in Urin und Faeces wurden unter den in 2.2.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

#### 2.2.5.3      *Chromatographische Trennung der Metaboliten im Urin*

Unter Verwendung von HPLC-System 1 unter den in 2.2.4.3 ausgeführten Bedingungen erfolgte die Auftrennung der Urinmetaboliten.

#### 2.2.5.4 Identifizierung der Urinmetaboliten

Die Signale im Radiochromatogramm wurden durch Co-Chromatographie mit nicht markierten Referenzsubstanzen eindeutig zugeordnet.

### 2.3 Statistische Auswertung

Die Berechnung der Absolutwerte, sowie der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S.D. = standard deviation) wurde mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Seattle, USA) durchgeführt. Signifikanzen wurden mit WinSTAT für EXCEL (Greulich Software, Staufen) berechnet. Zur Berechnung der Korrelationen wurde das Programm GraphPad Prism V.3.0 (GraphPad Inc., San Diego, USA) verwendet.

Soweit nicht anders vermerkt, werden die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (S.D.) angegeben.

#### Signifikanz

Inwieweit sich die erhobenen Daten einer Normalverteilung annähern lassen oder auch nicht, wurde mittels zweier direkter Prüfmethoden bestimmt. Zum einen bei kontinuierlichen Daten mit dem Anpassungstest nach Kolmogorov-Smirnov, zum anderen mit dem  $\chi^2$ -Test bei diskreten oder nicht-kontinuierlichen, in Form von Häufigkeiten vorliegenden Daten. Sind die Stichproben klein, entdeckt der Kolmogorov-Smirnov-Test die Nähe zur Normalverteilung besser, der  $\chi^2$ -Test findet starke Schwankungen innerhalb der Datenverteilung besser.

Gesamtvoraussetzung für die Durchführung des t-Test ist, dass die Variable intervall- oder verhältnisskaliert sowie normalverteilt ist. Die beiden gegeneinander zu testenden Datenreihen werden entweder über zwei separate Messungen erhalten, oder man teilt die Messvariable dichotomisch. Der t-Test prüft die Differenz der Mittelwerte der Datenreihen als entscheidenden Parameter auf Signifikanz. Als weiteres Kriterium zur Durchführung des t-Tests gilt der F-Test. Dieser prüft, ob die Stichproben normalverteilten Grundgesamtheiten entstammen. Dazu werden die Varianzen über ihren Quotienten verglichen. So wird untersucht, ob Unterschiede in den Stichprobenvarianzen noch als zufällig anzusehen sind oder ob diese Varianzen ungleich und damit statistisch signifikant auf dem Einfluss verschiedener Parameter beruhen. Es ist also zu unterscheiden, ob die Varianzen gleich bzw. homogen oder ungleich bzw. heterogen sind, worüber der F-Wert Auskunft gibt. Nach dem Ergebnis des F-Tests richtet sich anschließend das Verfahren zur Berechnung der Prüfgröße für den t-Test. Hier kommen unterschiedliche Algorithmen zum Einsatz. Diese variieren

darüber hinaus im homogenen wie auch heterogenen Fall in Abhängigkeit vom Stichprobenumfang der beiden Variablen.

Der U-Test eignet sich als Alternative, wenn der t-Test nicht durchgeführt werden darf. Im Prinzip unterscheidet sich der U-Test kaum vom t-Test für unabhängige Stichproben. Der eigentliche Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht aber darin, dass der t-Test ein parametrisches und der U-Test ein nicht-parametrisches Verfahren darstellt. Damit lässt sich der U-Test unabhängig von der Verteilungsart anwenden und alle Überlegungen zur Normalverteilung der Daten entfallen. Somit wird dieser Test zu einem Mittel der Wahl, wenn Tests, die auf Normalverteilung aufbauen, nicht zulässig sind und wenn sehr kleine Stichproben untersucht werden sollen. Der Vorteil bei solchen nicht-parametrischen Tests besteht darin, dass nicht die Messwerte selbst, sondern ihre Rangplätze verwendet werden, so dass eine Ordinalskalierung ausreichend ist.

### **Ausreißer**

Ausreißer wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels zweier Argumente ausgeschlossen. Einerseits stellte das Überschreiten eines Vielfachen der Varianz und andererseits das des 5%-Vertrauensbereiches ein Ausschlusskriterium dar.

### **Lineare Regression und Korrelation**

Die Aufgabe bei einer linearen Regression liegt darin, eine Menge von Messpunkten „möglichst gut“ durch eine Gerade anzunähern. Dabei ist die Quadratsumme QS aller Messpaare zu minimieren. Die beiden Faktoren  $a$  und  $b$ , die die Gerade der Form  $y=ax+b$  beschreiben, nennt man Regressionskoeffizienten. Die Multiplikation der Steigungen  $a$  bzw.  $a'$  (unter Tausch von  $x$  und  $y$ ) nähert sich dem Wert 1 mit Annäherung an den funktionalen Zusammenhang an und nennt sich Bestimmtheitsmaß  $r^2$ . Die Quadratwurzel dieses Werts nennt sich Korrelationskoeffizient.



## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Synthesen

Myosmin, HPB, Ketosäure, 3'-Hydroxymyosmin und 4'-Hydroxymyosmin wurden als Referenzsubstanzen für HPLC-UV-Messungen synthetisiert. Aufgrund des hydrophilen Charakters von 3-Pyridylelessigsäure und Ketosäure konnten diese nicht ohne vorherige Derivatisierung mit GC/MS-Methoden bestimmt werden. Daher wurden methylierte Derivate dieser Verbindungen hergestellt, die der GC/MS-Analytik zugänglich waren. Im folgenden soll nur auf zwei Synthesen näher eingegangen werden: Um die Ausbeute bei der Synthese von HPB zu verbessern, musste zunächst das Hauptnebenprodukt identifiziert werden. Dieses Wissen bildete schließlich die Grundlage für gezielte Verbesserungen im Syntheseablauf. Die Darstellung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Myosmin war notwendig, um ein Autoradiographie-Projekt mit Myosmin zu ermöglichen. Dabei sollte die zeitabhängige Verteilung von Myosmin in Ratten untersucht werden. Zunächst wurden Versuche mit kommerziell erhältlichem  $^3\text{H}$ -markiertem Myosmin durchgeführt. Aufgrund der leichten Abschirmbarkeit und Artefaktbildung auf den Image-Platten war die Auflösung beim Scannen der Ganzkörperschnitte nur unbefriedigend. Durch die Verwendung des stärkeren  $\beta$ -Strahlers  $^{14}\text{C}$  konnte das Projekt schließlich problemlos durchgeführt und ausgewertet werden (Glas, 2003).

#### 3.1.1 HPB, 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon

Die Synthese basierte auf einer Vorschrift von *Hecht et al.* (1977). Die angegebene Ausbeute von 49% konnte in ersten Versuchen bestätigt werden. Die Aufreinigung des Rohprodukts wurde durch Dünnschichtchromatographie bewerkstelligt. Dabei fiel auf, dass neben HPB im wesentlichen nur ein weiteres Nebenprodukt mit  $R_f$  0,54 entstand. Das Nebenprodukt konnte als Cyclopropyl-pyridin-3-yl-methanon identifiziert werden. Tabelle 3-1 zeigt eine Gegenüberstellung von Literaturdaten (Edwards, 1975; Sato et al., 1978; Hecht et al., 1981a) mit den gewonnenen Messwerten.  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden bei 300 bzw. 75,5 MHz aufgenommen wobei die Proben in  $\text{CDCl}_3$  gelöst wurden. Die chemische Verschiebung  $\delta$  bezieht sich auf TMS als internen Standard und wird in ppm angegeben. Für die GC/MS-Messungen kam ein Finnigan MAT 95Q mit einer CS Supreme-5 Trennsäule zum Einsatz. Die Probe wurde in  $\text{CHCl}_3$  eingespritzt und die enthaltenen Verbindungen in Abhängigkeit des verwendeten Temperaturgradienten von der Säule eluiert. So wurde die Temperatur 1 min bei 50 °C gehalten und mit einer Heizrate von 25 °C/min auf 300 °C erhöht. Die Säule wurde im Anschluss 4 min bei dieser Temperatur ausgeheizt.

Da das Hauptnebenprodukt somit identifiziert war, konnte mit der Optimierung der Synthese bezüglich der Ausbeute an HPB begonnen werden. So wurden im wesentlichen zwei Verbesserungen etabliert werden: Zum einen verfestigt sich das Reaktionsgemisch rasch nach Zugabe von Butyrolacton und Nikotinsäureethylester zum Natriummethanolat. Dies lässt sich effektiv durch den Einsatz eines KPG-Rührers verhindern. Ein weiterer kritischer Syntheseschritt ist die Einstellung des pH-Werts auf 12. Hierbei ist eine Erwärmung der Lösung unbedingt zu vermeiden, da sonst HPB teilweise zum Cyclopropyl-pyridin-3-yl-methanon abreagiert.

**Tabelle 3-1: Vergleich von Literaturdaten mit gefundenen Messwerten für Cyclopropyl-pyridin-3-yl-methanon (Edwards, 1975; Sato et al., 1978; Hecht et al., 1981a)**

Methode	Literaturdaten	Gefunden
$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta =$ )	1,16 (m, 4H) 2,63 (m, 1H) 7,33 (m, 1H) 8,16 (m, 1H) 8,59 (m, 1H) 9,19 (m, 1H)	1,15 (m, 4H) 2,61 (m, 1H) 7,39 (m, 1H) 8,22 (m, 1H) 8,73 (m, 1H) 9,20 (m, 1H)
$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta =$ )		12,1 (2 CH <sub>2</sub> ) 17,5 (CH) 123,5 (Pyr-CH) 133,1 (C <sub>q</sub> ) 135,2 (Pyr-CH) 149,4 (Pyr-CH) 153,0 (Pyr-CH) 199,3 (C=O)
GC/MS (EI 70 eV, $m/z$ , rel. Intensität)	147 (M <sup>+</sup> , 19) 146 (16) 118 (5) 106 (100) 79 (3) 78 (58) 69 (28) 51 (31)	147 (M <sup>+</sup> , 21) 146 (16) 118 (5) 106 (100) 79 (5) 78 (38) 69 (18) 51 (16)

Durch die beschriebenen Änderungen konnte das Verhältnis von HPB zu den Nebenprodukten deutlich verbessert werden. Die Intensität der Spots auf den Kieselgel-Dünnschichtplatten veränderte sich zu Gunsten von HPB von zuvor 50/50 auf 75/25.

Die Eignung des synthetisierten Produkts als Referenzsubstanz wurde durch HPLC-Messungen mit Spektrenvergleich überprüft (Abbildung 3-1). Man erkennt keine weiteren Signale im UV-Chromatogramm und das UV-Spektrum entspricht den Literaturdaten.

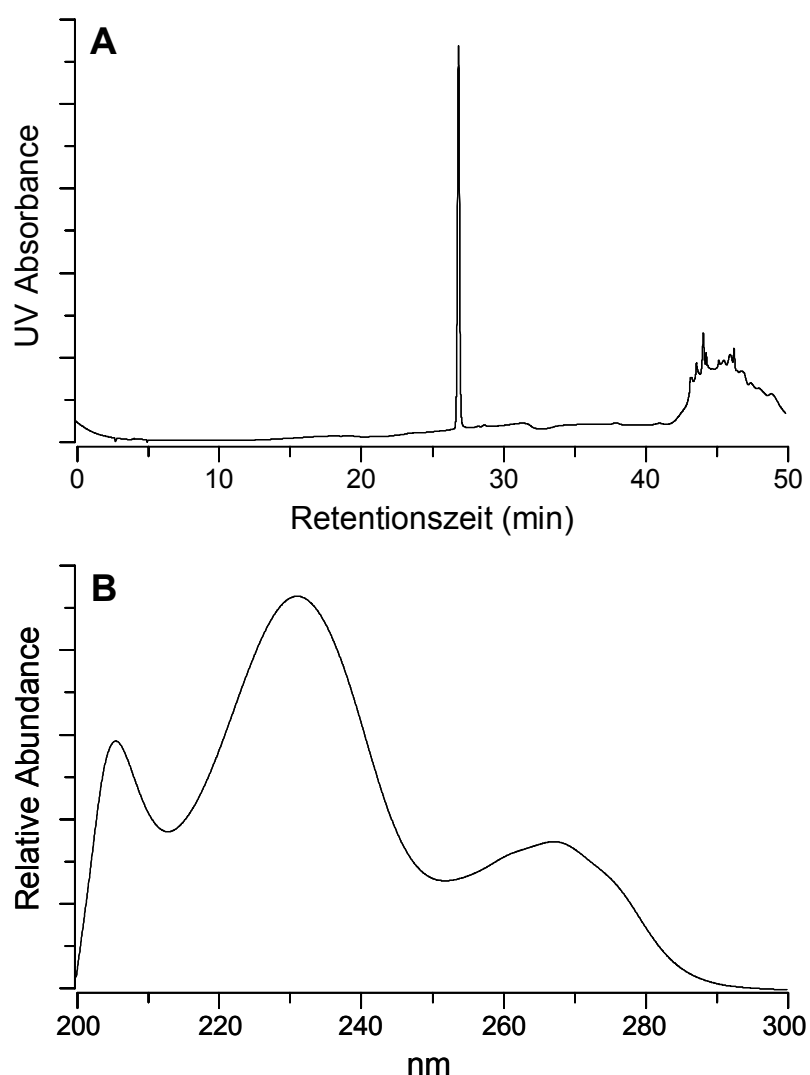


Abbildung 3-1: UV-Chromatogramm bei 254 nm (A) und UV-Spektrum (B) von synthetisiertem HPB

### 3.1.2 <sup>14</sup>C-markiertes Myosmin, [2'-<sup>14</sup>C]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridin

Es sollte eine einfache, für den Mikromaßstab geeignete Synthese aus kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffen etabliert werden. Letzteres verhinderte die Verwendung der gängigen Myosmin-Synthese (Brandänge und Lindblom, 1976), da <sup>14</sup>C-markierter Nikotinsäureethylester nicht zur Verfügung stand. Daher musste auf Nikotinsäure, die an der Carboxyl-Gruppe markiert war, zurückgegriffen werden. Eine bereits existierende Methode (Hu et al., 1974) verwendet ebenfalls dieses Edukt. Die Synthese sieht jedoch unter anderem eine fraktionierte Destillation zur Aufreinigung eines Zwischenprodukts vor, was für den

Mikromaßstab nur schwer adaptierbar ist. Deshalb wurde nach Alternativen für eine Veresterung der Nikotinsäure gesucht, welche in hohen Ausbeuten ablaufen sollte um eine Isolierung des Esters vor der Weiterreaktion zu umgehen. Letztlich wurde eine Methode unter Verwendung von 1,1,1-Triethoxyethan gewählt, die annähernd quantitativ abläuft (Trujillo und Gopalan, 1993). Ein weiterer Vorteil bestand im verwendeten Lösungsmittel. Da für die Veresterung Toluol verwendet wird, konnten die weiteren Reaktionsschritte ohne Wechsel des Lösungsmittels erfolgen.

Im Vorfeld zur Synthese unter Verwendung großer Mengen Radioaktivität wurden Tracer-Experimente durchgeführt um den Versuchsablauf zu überprüfen. Besonders die Übertragbarkeit der im Grammmaßstab eingesetzten Methoden auf den Mikromaßstab musste gewährleistet sein. Die Tracer-Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen wie der spätere Versuch durchgeführt, jedoch unter Verwendung von 99% nicht markierter und nur 1%  $^{14}\text{C}$ -markierter Nikotinsäure. Dabei wurden auch die Bedingungen für die Veresterung im Hinblick auf eine maximale Ausbeute optimiert. Das Verhältnis von Nikotinsäure zu 1,1,1-Triethoxyethan spielt dabei eine entscheidende Rolle. Bei Verwendung des vorgeschlagenen Verhältnisses von 1:3 für Nikotinsäure:1,1,1-Triethoxyethan waren nach Auftrennen des Produktgemisches mittels Dünnschichtchromatographie deutlich Nebenprodukte erkennbar. Veränderte man das Verhältnis auf 1:2, so konnte ein nahezu quantitativer Umsatz zum Nikotinsäureethylester beobachtet werden. Eine Destillation des Myosmins, wie von Brandänge und Lindblom vorgeschlagen, kann für die vorliegende Ansatzgröße nicht angewendet werden und wurde durch eine Aufreinigung mittels Kieselgelsäule ersetzt. Die Ausbeute an Myosmin lag bei den Tracer-Experimenten schließlich bei 53%. Dies entspricht der Ausbeute, die auch für die Synthese von Myosmin aus Nikotinsäureethylester angegeben wird, jedoch bei einem Reaktionsschritt, nämlich der Veresterung, weniger.

Bei Durchführung der Synthese mit 100%  $^{14}\text{C}$ -markierter Nikotinsäure konnte dieser Wert nicht erreicht werden. Die Ausbeute lag hier bei 15%. Es stellte sich heraus, dass die verwendete  $^{14}\text{C}$ -Nikotinsäure stark verunreinigt war. Betrug die radiochemische Reinheit noch 97,6%, so zeigten UV-Chromatogramme deutliche Verunreinigungen. Laut Berechnungen sollten für den Ansatz 2,5 mg  $^{14}\text{C}$ -markierte Nikotinsäure verwendet werden. Das Probengefäß enthielt jedoch ca. 10 mg Substanz. Auf eine weitere Aufreinigung wurde dennoch verzichtet, da die erhaltene Menge  $^{14}\text{C}$ -markierten Myosmins für die Durchführung des Autoradiographie-Projekts ausreichte. Man erhielt schließlich 130  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Myosmin mit einer spezifischen Aktivität von 55,2 mCi/mmol und einer radiochemischen Reinheit von 96,8% (Tyroller et al., 2003).

LC/MS-Messungen der Massen 147 ( $MH^+$ ) und 149 ( $MH^+$ ) bestätigten ebenso den Syntheseerfolg wie HPLC-Retentionszeitvergleiche (Abbildung 3-2).

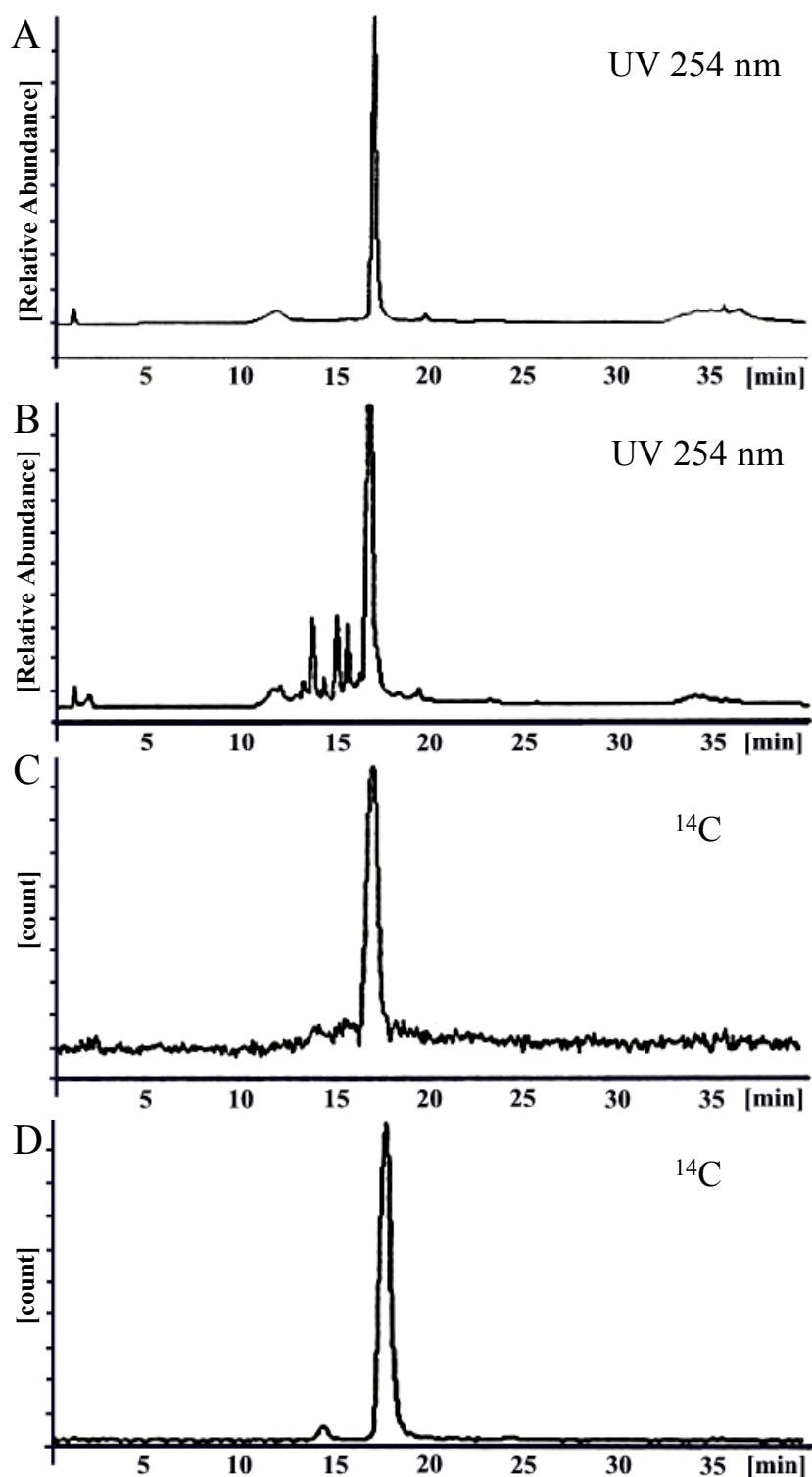


Abbildung 3-2: Vergleich der Retentionszeiten von nicht markiertem Myosmin (A) mit dem Tracer-Experiment (B) und den entsprechenden Radiochromatogrammen des Tracer-Experiments (C) und der späteren Synthese (D). Chromatogramm (D) bildete die Grundlage für die Berechnung der radiochemischen Reinheit von  $^{14}C$ -Myosmin.

## 3.2 Nachweis von Myosmin in Nahrungsmitteln

### 3.2.1 Analytik

#### 3.2.1.1 GC/MS-Verfahren

Um die Menge an Probenmaterial je Analyse möglichst klein halten zu können und damit die Aufarbeitung zu erleichtern und erheblich zu verkürzen, musste für den Myosmin-Nachweis im Spurenbereich ein hochempfindliches GC/MS-Verfahren entwickelt werden. Versuche zur UV-Detektion von Myosmin nach Isolierung aus diversen Lebensmittelmatrixen scheiterten sowohl an der Detektor-Nachweisgrenze als auch an zu hohen Blindwerten hervorgerufen durch zahlreiche Probenverunreinigungen.

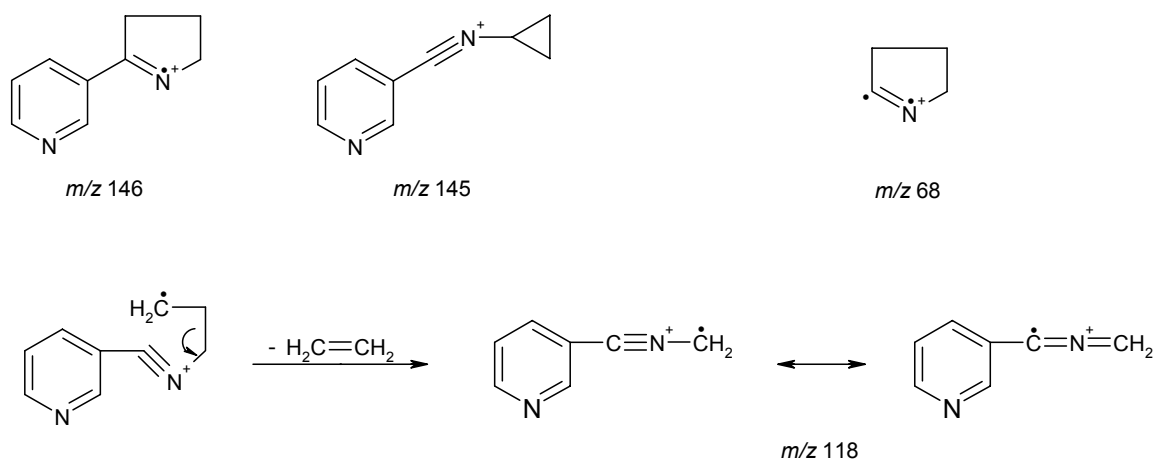
Nach Aufbringen der Substanz im „splittless“-Verfahren kommt es zu sofortiger Verdampfung. Mittels Helium als Trägergas erfolgt die Auftrennung des Substanzgemisches aufgrund der Flüchtigkeit und der Interaktion mit der stationären Phase der Säule. Die Trennung erfolgte mit einer schwach polaren ZB-50 Säule, deren stationäre Phase aus Methylpolysiloxangruppen mit einem 50 prozentigen Phenylanteil besteht. Alternativ brachte auch der Einsatz einer DB-5ms Trennsäule (5 prozentiger Phenylanteil) bei den vorherrschenden Messbedingungen keine entscheidenden Nachteile. Beide Säulen zeigten keine die Messung störenden Signale bei den relevanten Retentionszeiten, so dass kein Blindwert für die Auswertungen berücksichtigt werden musste. Die so getrennten Substanzen erreichen nacheinander das Säulenende und werden durch ein Quadrupol-Massenspektrometer detektiert.

Die in dieser Arbeit angewandte Elektronenstoß-Ionisierung (EI) bietet die Möglichkeit, nicht nur das Molekül selbst, sondern auch dessen charakteristische Zerfallsprodukte zu erfassen. Elektronen treffen mit einer Energie von 70 eV auf die aus der Kapillarsäule austretenden neutralen Moleküle. Dabei werden Elektronen aus dem Molekül ausgeschlagen und es entstehen positiv geladene Molekülionen.

#### 3.2.1.2 Identifizierung des Myosmins im Rahmen der GC/MS-Messung

Das Massenspektrum von Myosmin bei 70 eV liefert nur drei verwertbare Signale. Neben dem Molekülpeak ( $m/z$  146) lassen sich noch das M-1-Signal ( $m/z$  145) und der Basispeak bei  $m/z$  118 zuordnen (Abbildung 3-3). Eine denkbare  $\alpha$ -Spaltung, die zu einem Ion mit  $m/z$  68 führen würde, findet nicht statt, da bei diesem Prozess eine vinyliche Bindung gebrochen

werden müsste und dies somit kein bevorzugtes Spaltungsschema darstellt (Duffield et al., 1965; Glenn und Edwards, 1978).



**Abbildung 3-3: Zuordnung der Signale im 70 eV Massenspektrum von Myosmin**

### 3.2.1.3 Kalibrierkurven und Nachweisgrenzen von Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin

Zur Erstellung von Kalibrierkurven von Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin wurden Verdünnungsreihen der entsprechenden Substanzen hergestellt und mit GC/MS vermessen. Abbildung 3-4 zeigt die erhaltenen Kurven. Im Bereich zwischen 10 und 250 pg on column waren die beiden Geraden annähernd deckungsgleich. D<sub>4</sub>-Myosmin konnte deshalb ohne Korrekturfaktor als interner Standard verwendet werden. Auch bei größeren Myosmin-Mengen ist nur ein kleiner Drift der Kurven zu beobachten. Dieser Kurvenabschnitt liegt jedoch weit vom tatsächlichen Messbereich der Lebensmittelextrakte entfernt.

Aus diesen Untersuchungen ergaben sich ferner die Nachweisgrenzen. Prinzipiell ist die Nachweisgrenze definiert als die in die GC/MS eingebrachte Substanzmenge, die gerade noch die Mindestanforderung eines Peak-Rausch-Verhältnisses von 3 zu 1 erfüllt. Diese beträgt sowohl für Myosmin als auch für D<sub>4</sub>-Myosmin  $15 \pm 5$  pg on column. Diese Werte ergeben sich aus den jeweils ersten messbaren Konzentration der Kalibrierkurven. Da diese Werte jedoch stark von der Empfindlichkeit des GC/MS-Systems, welche vor allem vom Alter des Filaments, Alter der Säule und der Empfindlichkeit des Multipliers abhängt, sind diese Werte nicht auf alle durchgeführten Messungen zu verallgemeinern.

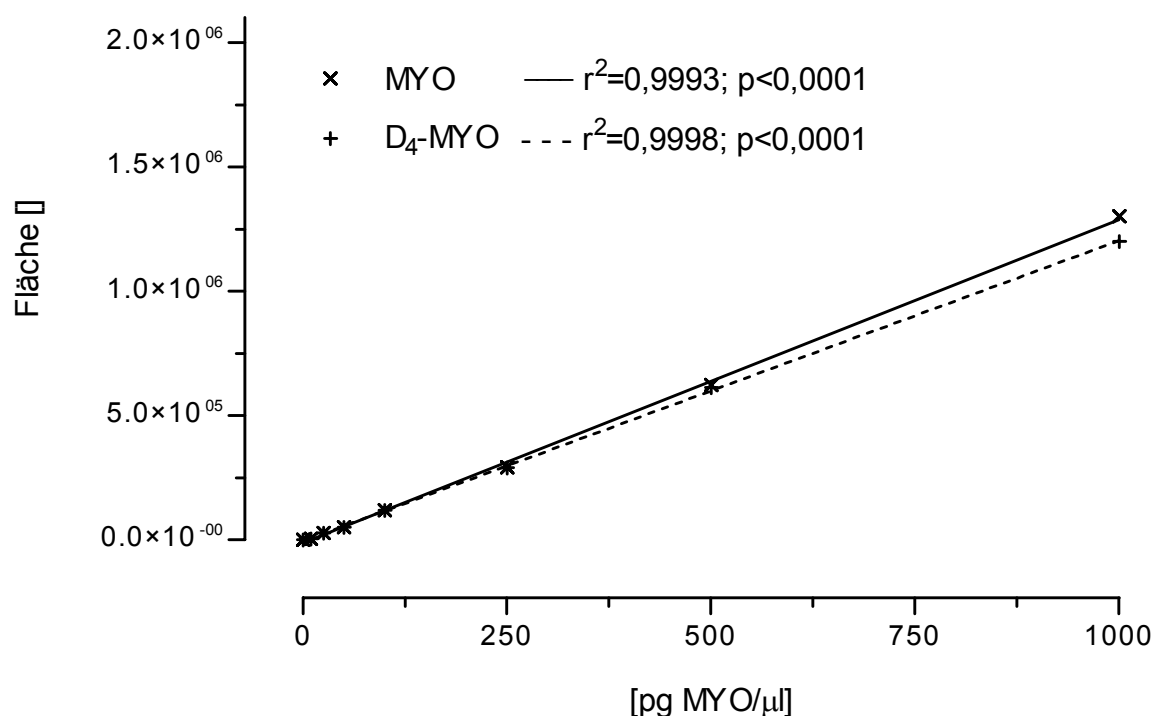


Abbildung 3-4: Kalibrierkurven von Myosmin und D<sub>4</sub>-Myosmin im Bereich von 0 bis 1000 pg on column

#### 3.2.1.4 Bestimmung von Wiederfindungsraten

Exemplarisch wurden vier Maismehlproben zu Beginn des Analysenganges mit jeweils ca. 100000 dpm <sup>3</sup>H-Myosmin versetzt. Durch Messung der Radioaktivität am Ende der Probenaufarbeitung konnte die Wiederfindung bestimmt werden. Die Wiederfindung von <sup>3</sup>H-Myosmin nach Aufarbeitung der Maismehlproben lag bei  $75,1 \pm 8,1\%$  (Tabelle 3-2). Für andere Matrices wurde keine Wiederfindungsrate bestimmt, da die Quantifizierung mittels internem Standard eventuell schlechtere Wiederfindungsraten ausgleicht. Es wurde allen Proben die gleiche Menge internen Standards zugesetzt und bei keiner Probe waren die MS-Signale unter der Nachweisgrenze. Daraus kann für die einzelnen Lebensmittelmatrices auf eine stabile Analytik mit nur geringen Schwankungen der Wiederfindungsraten geschlossen werden.

Die Probenaufarbeitung besteht aus vielen aufeinanderfolgenden Einzelschritten, von denen jeder die Gefahr eines unverhältnismäßig hohen Verlusts an Analyten birgt. Um einen solchen kritischen Schritt im Analysengang ausfindig zu machen, wurden nach jedem Abschnitt Aliquots entnommen und vermessen. Daraus konnte geschlossen werden, dass sich der Gesamtverlust gleichmäßig aus kleinen Beiträgen der einzelnen Analysenschritte zusammensetzt. Es musste folglich nichts am Analysenablauf optimiert werden.



**Tabelle 3-2: Wiederfindungsraten nach Zusatz  $^3\text{H}$ -markierten Myosmins zu Maismehlproben**

Probe	Zugesetzte dpm/Probe	Gefundene dpm/Probe	Wiederfindung [%]
1	114100	80360	70,4
2	114100	79348	69,5
3	114100	99244	87,0
4	114100	83710	73,4

### 3.2.2 Auswahl der Lebensmittel

Die für die Analyse verwendeten Lebensmittel sollten verschiedene Bereiche des täglichen Lebens abdecken. Daher wurden sowohl Grundnahrungsmittel wie auch verschiedene Obst- und Gemüsesorten sowie ausgewählte Genussmittel getestet (Tabelle 3-3).

**Tabelle 3-3: Untersuchte Vertreter und ihre Zugehörigkeit zu verschiedenen Pflanzenfamilien**

Pflanzenfamilie		Untersuchte Vertreter
Gramineae	Süßgräser	Weizen Reis Mais
	Sauergräser	Hirse
Solanaceae	Nachtschattengewächse	Kartoffel Tomate
Umbelliferae	Doldenblütler	Karotte
Sterculiaceae	Sterkuliengewächse	Kakao
Rosaceae	Rosengewächse	Apfel
Bromeliaceae	Ananasgewächse	Ananas
Actinidiaceae	Strahlengriffelgewächse	Kiwi
Compositae	Korbblütler	Kopfsalat
Chenopodiaceae	Gänsefußgewächse	Spinat
Cucurbitaceae	Kürbisgewächse	Gurke
Liliaceae	Lauchgewächse	Zwiebel
Vitaceae	Weinrebengewächse	Weintrauben
Musaceae	Bananengewächse	Banane
Rutaceae	Rautengewächse	Mandarine Zitrone

Zu den untersuchten Genussmitteln zählen Popcornmais und Kakaopulver für den Instant-Gebrauch. Darüber hinaus wurden Milchprodukte mit verschiedenem Fettgehalt analysiert. Nachdem zunächst in fettarmer H-Milch (1,5% Fettgehalt) Myosmin qualitativ nachweisbar war, wurden für die quantitativen Analysen H-Vollmilch (3,5% Fettgehalt) und Sahne (30% Fettgehalt) verwendet. Das Fett verklumpt nach Zusatz von Säure rasch und kann leicht abgetrennt werden. Die restlichen Schritte der Probenaufarbeitung verlaufen selbst für Sahneproben problemlos.

### 3.2.3 Identifizierung von Myosmin in Nahrungsmittelprouben

Um einen qualitativen Nachweis von Myosmin in den ausgewählten Lebensmitteln zu erhalten, wurden diese zunächst mit  $n = 4$  und ohne Zusatz eines internen Standards analysiert. Die GC/MS-Messungen fanden im Scan-Mode statt. Zum Vergleich der Retentionszeiten wurden Läufe mit Standards durchgeführt. Tabelle 3-4 zeigt eine Übersicht der positiv bzw. negativ getesteten Lebensmittel.

**Tabelle 3-4:** Übersicht der positiv und negativ auf Myosmin getesteten Lebensmittel

Myosmin nachweisbar	Myosmin nicht nachweisbar
Weizen	
Reis	
Mais	
Hirse	Kopfsalat
Kartoffel	Spinat
Tomate	Gurke
Karotte	Zwiebel
Kakao	Weintrauben
Apfel	Banane
Ananas	Mandarine
Kiwi	Zitrone
Milch	
Sahne	

Abbildung 3-5 zeigt die GC/MS-Chromatogramme der beiden Massen  $m/z$  146 und 118 einer Myosmin-Standardlösung. Die Retentionszeit von Myosmin beträgt 8,893 min.

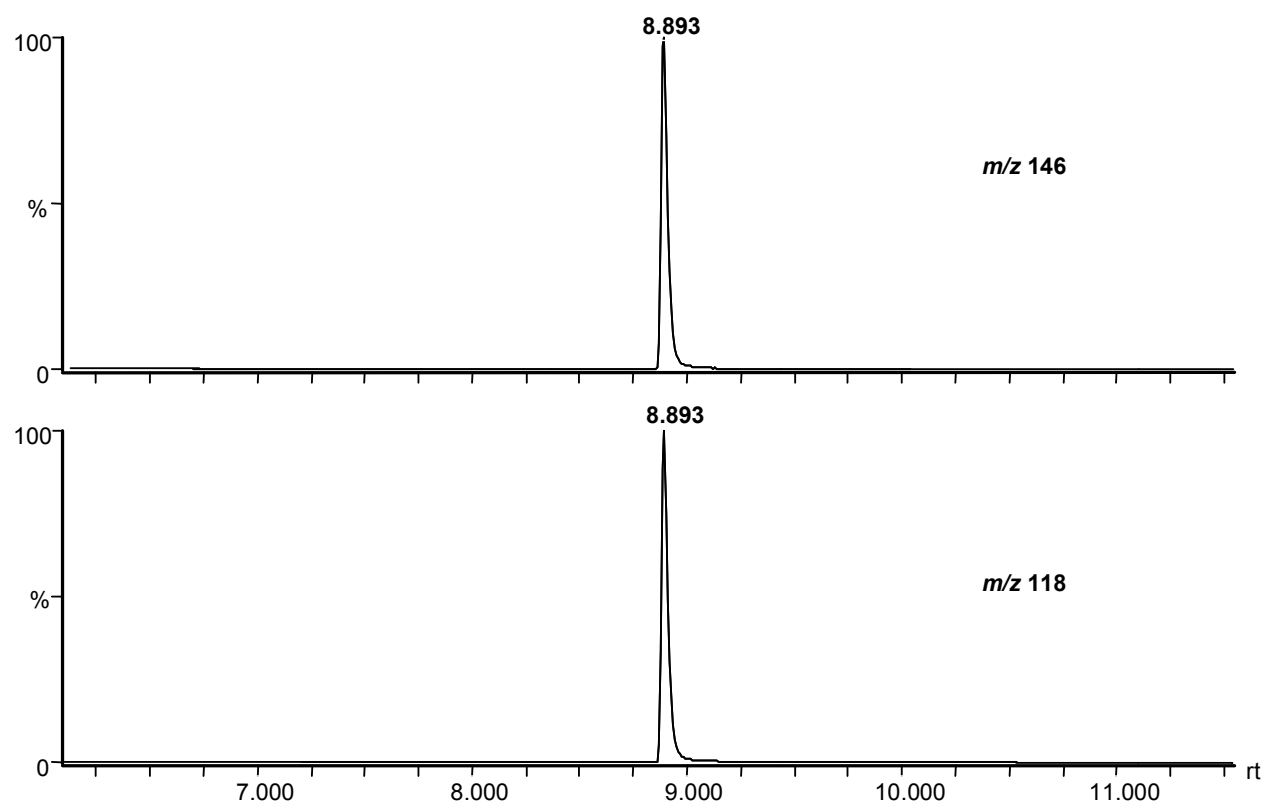


Abbildung 3-5: GC/MS-Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  146 und 118 eines Myosmin-Standards

Bei der Interpretation der entsprechenden Massenspektren wurde vor allem auf das charakteristische Verhältnis der beiden Massen 118 und 146 geachtet, wie dies in Abbildung 3-6 für einen Myosmin-Standard dargestellt ist.

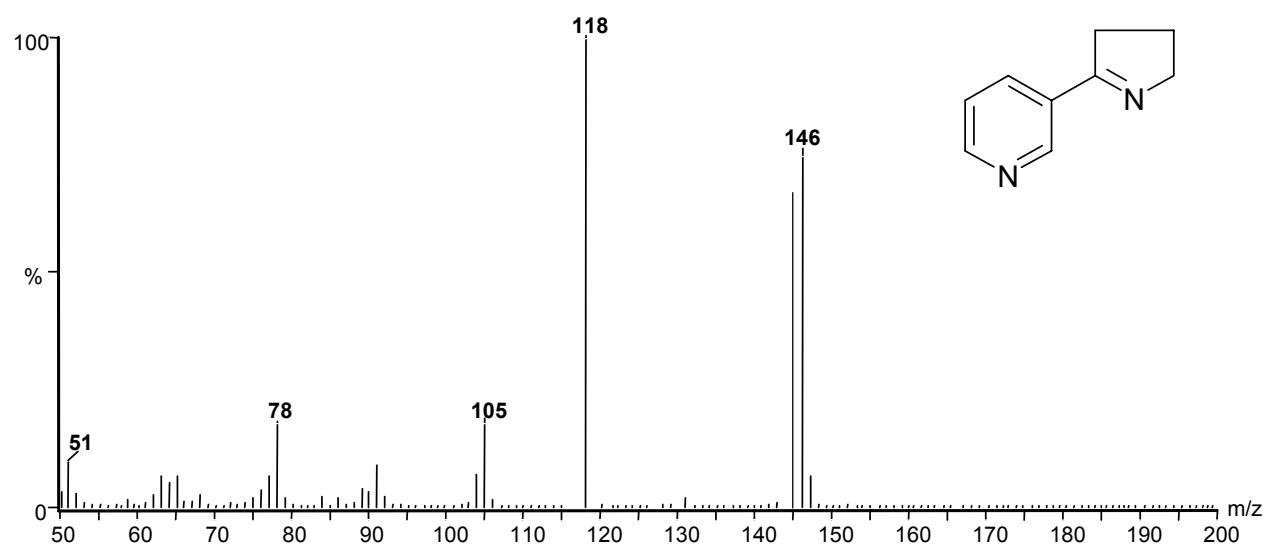


Abbildung 3-6: Massenspektrum von Myosmin-Standard

### 3.2.4 Quantifizierung von Myosmin in Lebensmitteln

Nur diejenigen Lebensmittel, in denen Myosmin qualitativ nachgewiesen werden konnte, wurden mit  $n = 6$  und unter Zusatz von  $D_4$ -Myosmin erneut untersucht. Deuteriertes Myosmin zeigt aufgrund der leicht erhöhten Polarisierbarkeit des Moleküls schwächere Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial und verläßt daher die Säule bei einer geringfügig kürzeren Retentionszeit verglichen mit  $D_0$ -Myosmin. Messungen des internen Standards zeigen daher eine Retentionszeit von 8,891 min (Abbildung 3-7).

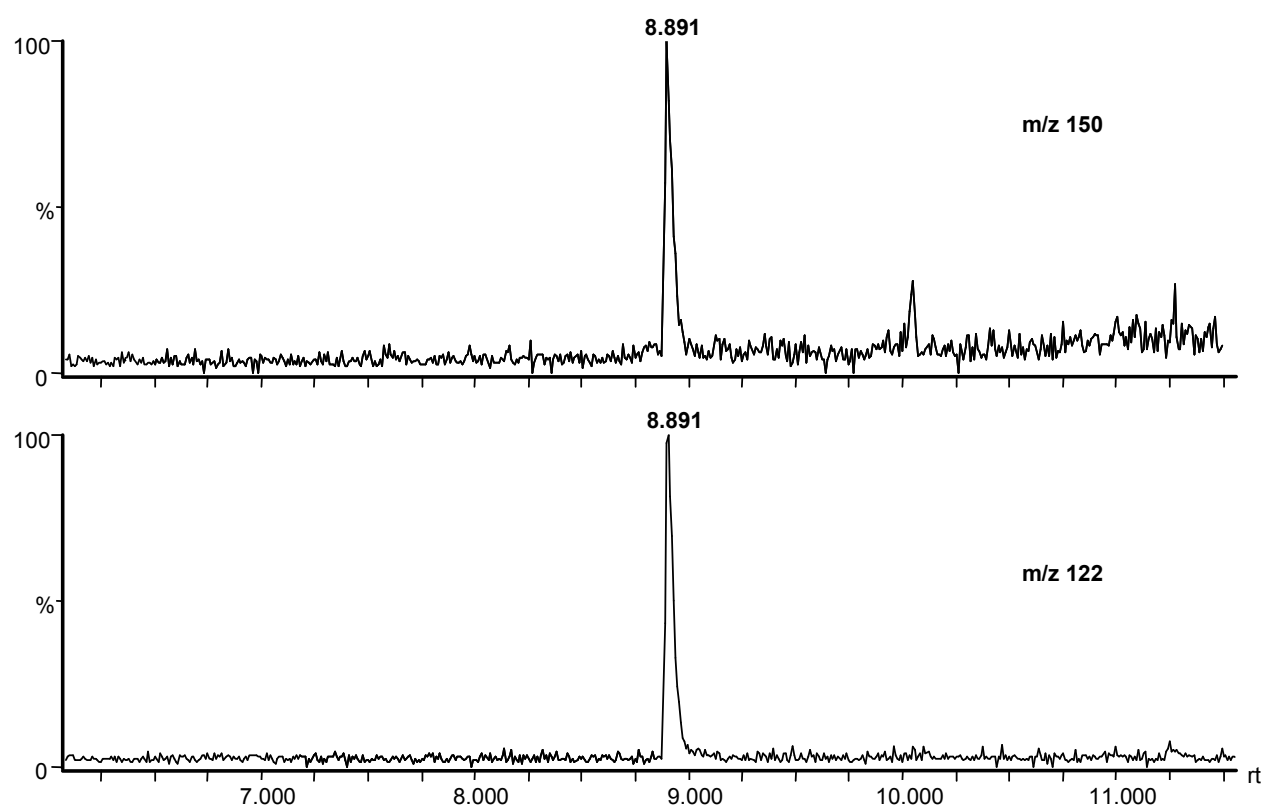


Abbildung 3-7: GC/MS-Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  150 und 122 eines  $D_4$ -Myosmin-Standards

Alle Positionen des H/D-Austausches zur Herstellung von  $D_4$ -Myosmin liegen ausschließlich im Pyridinring. Daher zeigen sich aufgrund des Spaltungsmusters auch alle Massenfragmente um die Masse 4 verschoben. Die relativen Intensitäten der verschiedenen Massen zeigen keine Abweichungen zu undeuteriertem Myosmin (Abbildung 3-8).

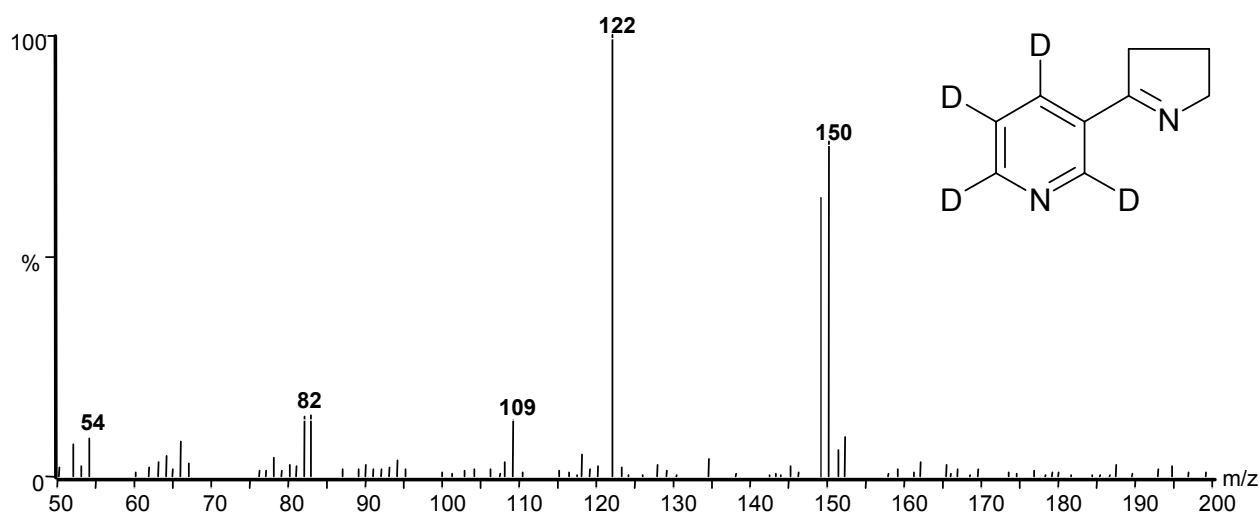


Abbildung 3-8: Massenspektrum eines D<sub>4</sub>-Myosmin-Standards

Für die quantitativen Untersuchungen der Lebensmittelproben wurden SIM-Messungen durchgeführt. Diese erfassten die Massen  $m/z$  51, 78, 105, 118, 146 für D<sub>0</sub>-Myosmin sowie 122 und 150 für D<sub>4</sub>-Myosmin. Bei keiner der untersuchten Matrices wurde unter diesen Messbedingungen zur relevanten Retentionszeit ein Blindwert detektiert. Daher konnte die Quantifizierung direkt über das Verhältnis der Signalflächen (118/122) und die Menge an eingesetztem internem Standard erfolgen. Abbildung 3-9 zeigt die GC/MS-Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  118, 122, 146 und 150 einer Sahne-Probe. Trotz effektiver Aufreinigung des Probenmaterials ist keine vollständige Entfernung der nicht erwünschten Lebensmittelbestandteile möglich. Es tritt daher eine verzögerte Elution des Analyten von der GC-Säule auf, die auf Einflüsse der verbliebenen Lebensmittelmatrix zurückzuführen ist.

Das Massenspektrum einer Sahne-Probe ist in Abbildung 3-10 gezeigt. Die relativen Intensitäten der Ionen  $m/z$  51, 78, 105, 118 und 146 entsprechen Molekulation und Myosmin-Fragmenten der Standard-Messungen. Das Verhältnis der Ionen  $m/z$  122 und 150, die den internen Standard repräsentieren, entspricht ebenfalls dem der D<sub>4</sub>-Myosmin-Standard-Messungen.

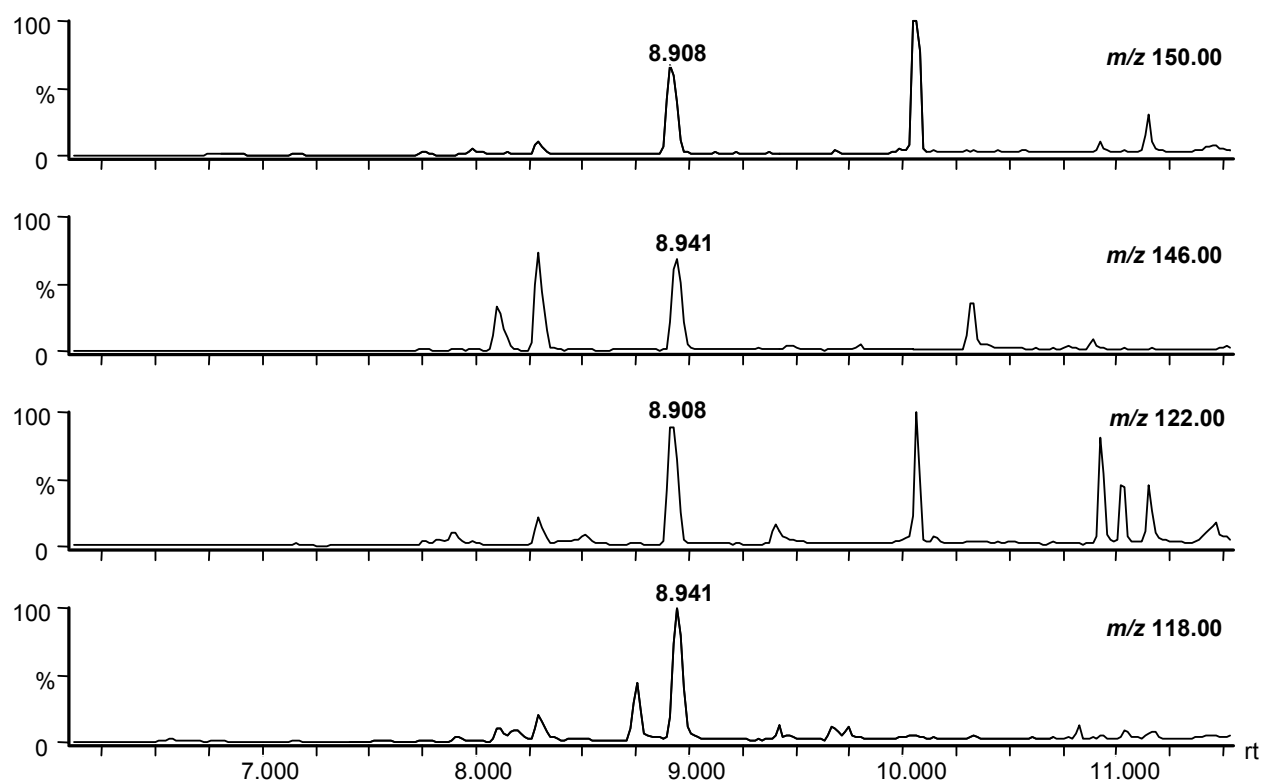


Abbildung 3-9: GC/MS-Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  118, 122, 146 und 150 einer Sahne-Probe

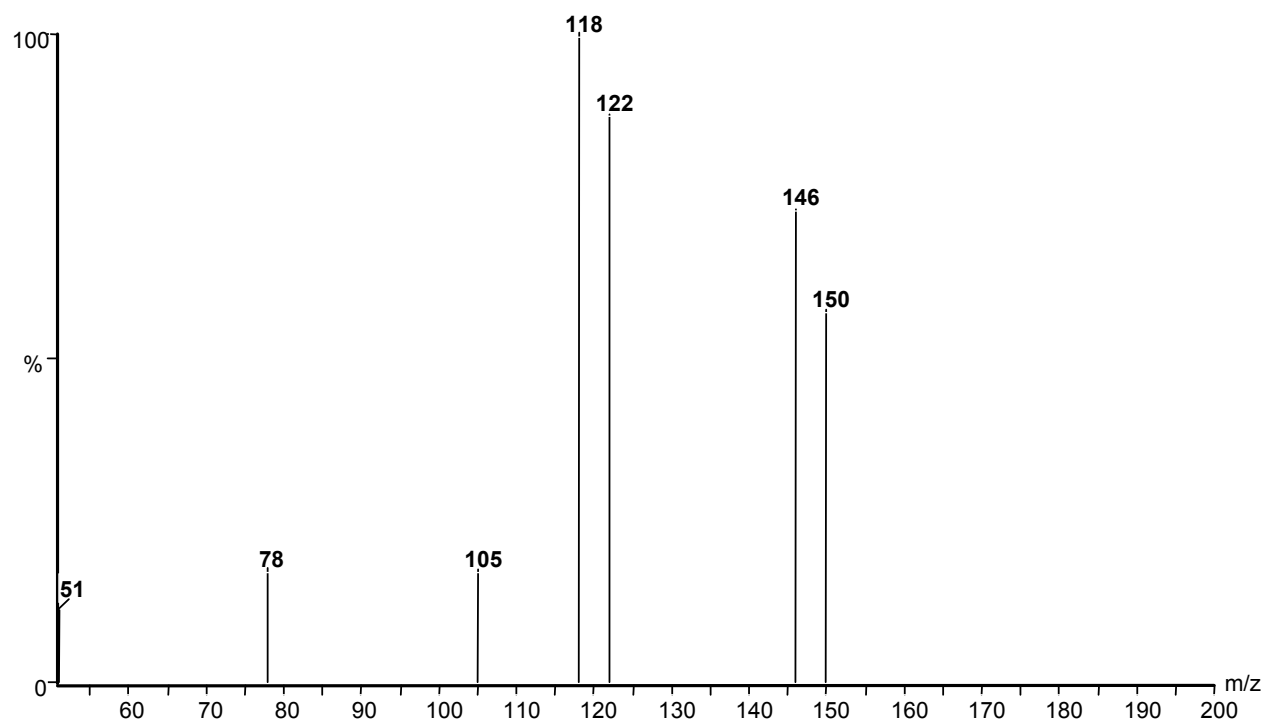


Abbildung 3-10: Massenspektrum einer Sahne-Probe mit den relevanten Ionen  $m/z$  51, 78, 105, 118, 122, 146 und 150

Die Ergebnisse der quantitativen Analysen der verschiedenen Lebensmittel unter Angabe der Beschaffenheit des Probenmaterials sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst (Tyroller et al., 2002).

**Tabelle 3-5: Myosmin-Konzentration in verschiedenen Lebensmitteln**

Lebensmittel	Myosmin (ng/g) $\pm$ SD (n = 6)	Bereich (ng/g)
Weizenmehl (roh)	0,4 $\pm$ 0,05	0,37 – 0,51
Reis (geschält, roh)	0,6 $\pm$ 0,4	0,19 – 1,15
Popcornmais (roh)	4,8 $\pm$ 0,4	4,44 – 5,66
Maismehl (roh)	1,3 $\pm$ 0,4	0,48 – 1,60
Hirse (roh)	0,4 $\pm$ 0,01	0,41 – 0,43
Kartoffel (gekocht, geschält)	3,4 $\pm$ 0,7	2,41 – 4,47
Tomate (roh)	0,6 $\pm$ 0,05	0,53 – 0,66
Karotte (roh)	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 – 0,03
Kakaopulver (roh)	0,8 $\pm$ 0,06	0,68 – 0,85
Apfel (geschält, roh)	1,2 $\pm$ 0,04	1,12 – 1,25
Ananas (geschält, roh)	0,7 $\pm$ 0,03	0,66 – 0,72
Kiwi (geschält, roh)	1,4 $\pm$ 0,2	1,15 – 1,61
Milch (3,5% Fett)	1,2 $\pm$ 0,07 (ng/ml)	1,16 – 1,35
Sahne (30% Fett)	6,1 $\pm$ 0,13	5,93 – 6,26

Die Mengen an nachgewiesenem Myosmin lagen im Bereich zwischen 0,02 ng/g bei Karotten und 6,1 ng/g für Sahne. Ebenfalls hohe Werte wurden für Popcornmais und Kartoffeln detektiert.

Die Schale von Kartoffeln (nach dem Kochen), Äpfeln, Kiwis, Ananas, Gurken, Bananen, Mandarinen und Zitronen wurde separat untersucht. Die Messwerte lagen allesamt in der gleichen Größenordnung wie für den Teil des Lebensmittels, welcher gemeinhin verzehrt wird. Daher wurde auf weitergehende Untersuchungen des Schalenmaterials verzichtet.

Da verschiedene der ausgewählten Lebensmittel unter normalen Bedingungen nicht roh konsumiert werden, sondern erst in gekochtem Zustand, wurde auch dieser Aspekt berücksichtigt. Um die Möglichkeit eines Übergehens des Analyten in die Kochflüssigkeit auszuschließen, wurden Kartoffeln ebenso wie Reisproben vor der Analyse in Leitungswasser

gekocht. Aufgrund ihres hohen Stärkegehalts erschwerte vorheriges Kochen jedoch den Analysenablauf beträchtlich. Insbesondere Reisproben waren nur noch schwer aufzuarbeiten. Es konnte jedoch in beiden Fällen kein Einfluss der Zubereitung auf den Myosmin-Gehalt nachgewiesen werden. Die gefundenen Messwerte vor und nach dem Kochen lagen in der selben Größenordnung.

### **3.3 Myosmin-Metabolismus in Wistar-Ratten**

#### **3.3.1 Applikation und Probengewinnung**

Die Verabreichung von Myosmin mittels eines präparierten Apfelstücks erwies sich als äußerst schonende und sichere Methode. Es konnte gewährleistet werden, dass eine definierte Menge des Stoffes zu einem bestimmten Zeitpunkt aufgenommen wird. Die Beimischung von Myosmin zum Futter hätte kein praktikables Vorgehen dargestellt, da weder genaue Aussagen über die aufgenommene Menge noch zum Zeitpunkt der Aufnahme getroffen werden können. Auch eine i.v.-Applikation wurde in Betracht gezogen, jedoch birgt diese Methode nicht nur ein erhöhtes Stresslevel der Tiere, sondern Myosmin würde dem Organismus auf einem Weg angeboten, der die Realität in keinsten Weise widerspiegelt. Nachdem Myosmin in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln nachgewiesen wurde, sollte dieses Ergebnis auch in die Versuchsplanung der Metabolismus-Studie eingehen. Die angewandte Methode bezieht daher eine mögliche metabolische Aktivierung von Myosmin im Mund- und Ösophagus-Bereich mit ein, was auch ein Ausschlusskriterium für die Verabreichung mittels Schlundsonde darstellte.

Die ausgeschiedene Urinmenge lag in den ersten sechs Stunden bei durchschnittlich 3,5 ml je Tier. Im Zeitraum 7-24 h fielen etwa 10 ml/Tier an und zwischen 24 und 48 h 15 ml/Tier. Jedes Tier produzierte im Versuchszeitraum von 48 h circa 16 g Faeces. In Einzelfällen traten Verunreinigungen der Proben durch Futtermittelreste auf. Diese konnten jedoch wegen der Verwendung gepressten Rattenfutters leicht mit einer Pinzette entfernt werden.

#### **3.3.2 Elimination von Myosmin über Urin und Faeces**

Die zeit- und dosisabhängige Ausscheidung von Myosmin wurde durch Radioaktivitätsmessung der Urin- und Faecesproben bestimmt. Dabei wurden insgesamt zwischen  $87,9 \pm 21,1\%$  und  $100,5 \pm 26,8\%$  der applizierten radioaktiven Dosis in Urin und Faeces wiedergefunden. Die relative Ausscheidung über Urin und Faeces zeigte eine



Dosisabhängigkeit. Bei Tieren, denen man die beiden niedrigeren Dosen verabreichte, wurde ein höherer Prozentsatz der Radioaktivität im Urin gefunden, wogegen Tiere, die 0,5 bzw. 50  $\mu\text{mol/kg}$  KG erhielten, eine geringere Ausscheidung über den Urin zeigten. Die Anteile für Radioaktivität im Urin nach 48 h gingen von  $86,2 \pm 4,9\%$  und  $88,9 \pm 1,7\%$  auf  $77,8 \pm 7,3\%$  bzw.  $75,4 \pm 6,6\%$  zurück (Tabelle 3-6). Bereits 6 h nach Applikation konnten  $88,5 \pm 2,5\%$  (0,001  $\mu\text{mol/kg}$ ),  $87,3 \pm 7,6\%$  (0,005  $\mu\text{mol/kg}$ ),  $79,0 \pm 22,1\%$  (0,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) und  $78,1 \pm 7,9\%$  (50  $\mu\text{mol/kg}$ ) der gesamt über den Urin ausgeschiedenen Radioaktivität nachgewiesen werden. Nach 24 h stiegen die Werte auf  $97,4 \pm 1,4\%$  (0,001  $\mu\text{mol/kg}$ ),  $98,1 \pm 0,4\%$  (0,005  $\mu\text{mol/kg}$ ),  $97,3 \pm 1,1\%$  (0,5  $\mu\text{mol/kg}$ ) und  $95,2 \pm 6,3\%$  (50  $\mu\text{mol/kg}$ ). Die Messwerte zeigen demnach, dass die Elimination von Myosmin über Urin nach 24 h fast vollständig abgeschlossen ist. Abbildung 3-11 zeigt die dosisabhängige Elimination von  $^3\text{H}$ -Myosmin bzw. seiner Metaboliten mit dem Urin. Gezeigt werden die Mittelwerte, welche sich auf die insgesamt verabreichte Radioaktivitätsmenge beziehen. Aus den Kurvenverläufen lässt sich auch die verminderte Ausscheidung über den Urin für die beiden höheren Konzentrationen verbunden mit einer vermehrten Elimination über die Faeces gut erkennen.

**Tabelle 3-6: Zeit- und Dosis-abhängige Elimination von  $^3\text{H}$ -Myosmin bzw. seiner Metaboliten in Urin und Faeces von Wistar-Ratten <sup>a</sup>**

Dosis	Urin <sup>b</sup>				Faeces <sup>b</sup>	Gesamt <sup>c</sup>
$\mu\text{mol/kg}$ KG	0 - 6 h	6 – 24 h	24 – 48 h	0 – 48 h	0 – 48 h	0 – 48 h
0,001	$76,9 \pm 4,4$	$7,8 \pm 1,7$	$1,5 \pm 0,8$	$86,2 \pm 4,9$	$13,8 \pm 4,9$	$100,5 \pm 26,8$
0,005	$77,9 \pm 6,4$	$9,7 \pm 6,5$	$1,3 \pm 0,5$	$88,9 \pm 1,7$	$11,1 \pm 1,7$	$100,2 \pm 16,4$
0,5	$61,5 \pm 17,8$	$14,5 \pm 17,3$	$1,8 \pm 0,8$	$77,8 \pm 7,3$	$22,2 \pm 7,3$	$87,9 \pm 21,1$
50	$59,8 \pm 11,0$	$12,9 \pm 1,4$	$2,7 \pm 3,3$	$75,4 \pm 6,6$	$24,6 \pm 6,6$	$96,7 \pm 26,7$

<sup>a</sup> Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4, außer für 50  $\mu\text{mol/kg}$  KG: n = 3)

<sup>b</sup> Prozent der insgesamt in Urin und Faeces wiedergefundenen Radioaktivität

<sup>c</sup> Prozent der insgesamt applizierten Radioaktivität

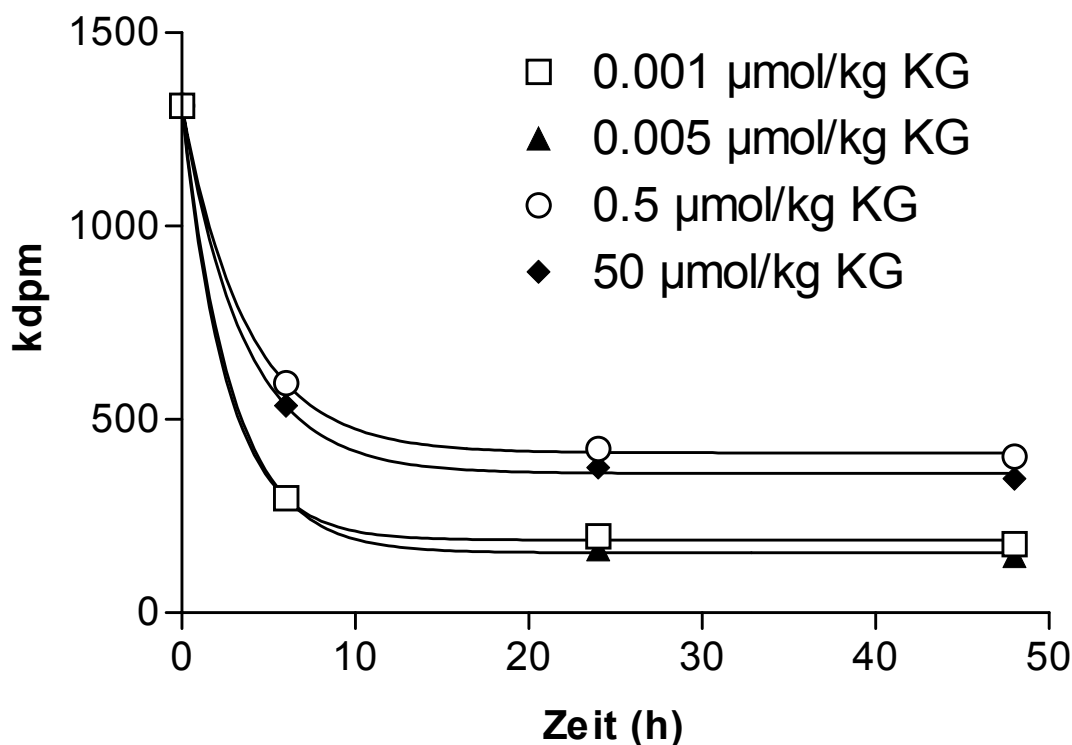


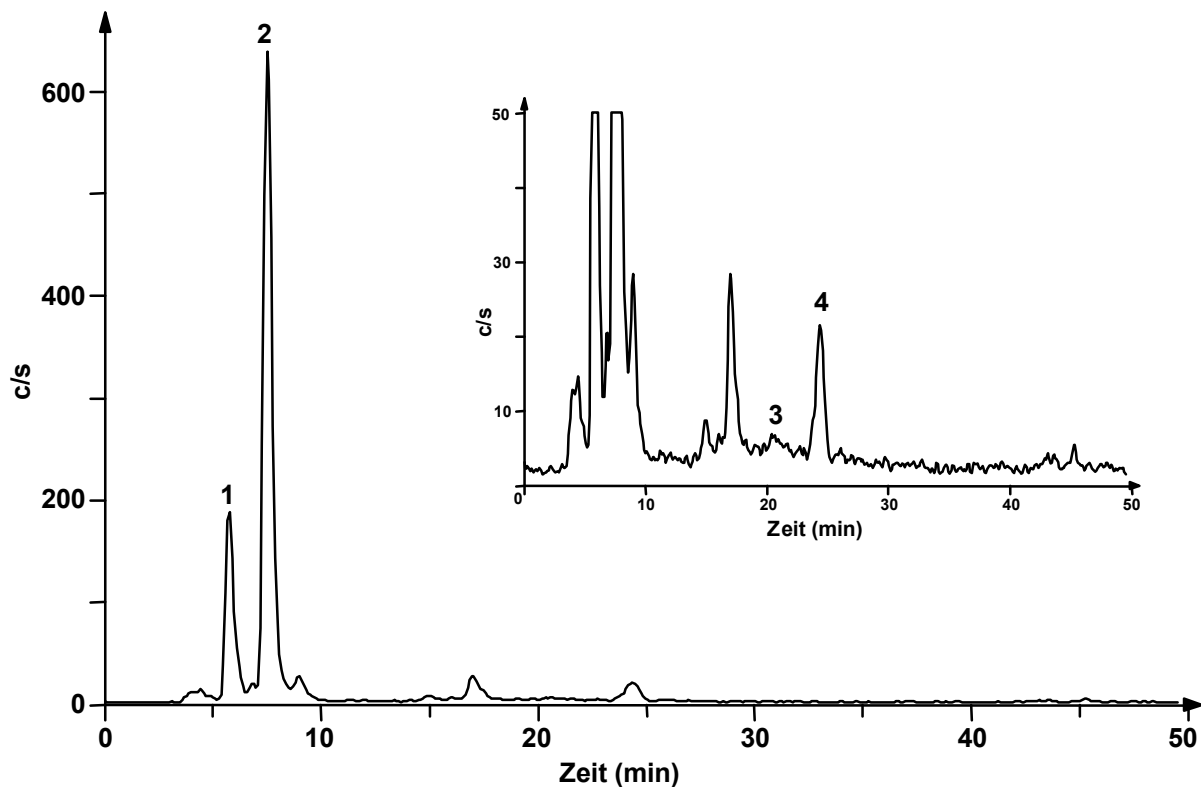
Abbildung 3-11: Dosisabhängige Elimination von  $^3\text{H}$ -Myosmin bzw. seiner Metaboliten (Mittelwerte, basierend auf gesamt verabreichter Radioaktivität)

### 3.3.3 Erfassung des Metabolitenspektrums

Aliquots der Urinfraktionen 0–6 h wurden mittels HPLC an RP-18-Material getrennt und das Metabolitenspektrum nach Zumischung eines Flüssigscintillators durch einen online-Radioaktivitätsdetektor erfasst. Da die Fraktionen 6–24 h und 24–48 h nur geringe Radioaktivitätsmengen enthielten, wurden diese nicht auf ihre Metabolitenverteilung untersucht. Die Nachweisempfindlichkeit des Detektors erwies sich trotz Scintillator-Zumischung als nicht ausreichend für diese geringen Mengen. Ein exemplarisches Radiochromatogramm der 0–6 h Fraktion ist in Abbildung 3-12 gezeigt. Neben den zwei Hauptmetaboliten sind weitere fünf bis sechs kleinere Signale zu erkennen. Es wurde in keiner 0–6 h Probe unmetabolisiertes Myosmin detektiert, was für eine rasche und vollständige Verstoffwechslung spricht.

Auf die Charakterisierung einzelner Metaboliten wird in Abschnitt 3.3.4 näher eingegangen. Die beiden Hauptmetaboliten mit Retentionszeiten von 4,3 min bzw. 6,3 min konnten als 3-Pyridylessigsäure und Ketosäure identifiziert werden. Der prozentuale Anteil von 3-Pyridylessigsäure an der Gesamtmetaboliten-Radioaktivität zeigte keine Dosisabhängigkeit und lag bei durchschnittlich  $23,2 \pm 2,6\%$  über den gesamten Konzentrationsbereich. Dagegen

erhöhte sich der Anteil an Ketosäure signifikant bei Tieren nach Gabe von 50 µmol/kg KG. Verglichen mit den drei kleineren Dosierungen (durchschnittlich  $52,0 \pm 2,3\%$ ,  $P < 0,05$ ) stieg der Ketosäure-Anteil auf  $63,1 \pm 2,9\%$  (Tabelle 3-7).



**Abbildung 3-12: HPLC Radiochromatogramm von 0-6 h Urin einer Wistar-Ratte nach Gabe von  $^3\text{H}$ -Myosmin. Die gezeigten Chromatogramme wurden im Zuge der Metaboliten-identifizierung mit HPLC-System 2 aufgezeichnet, wogegen die Quantifizierung ausschließlich an HPLC-System 1 durchgeführt wurde. Die Signale 1 und 2 repräsentieren die beiden Hauptmetaboliten 3-Pyridylessigsäure bzw. Ketosäure. Zwei der kleineren Signale konnten als 3'-Hydroxymyosmin (3) und HPB (4) identifiziert werden. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt weitere bisher noch nicht charakterisierte Signale.**

3'-Hydroxymyosmin konnte bei einer Retentionszeit von 21,3 min detektiert werden. Sein Anteil beträgt durchschnittlich  $1,93 \pm 0,33\%$  im gesamten Dosisbereich. Die Retentionszeit von HPB lag bei 27,1 min. Dieser Metabolit trägt im Durchschnitt über alle Dosierungen  $2,2 \pm 0,5\%$  zum Gesamtmetabolismus von Myosmin bei.

Der prozentuale Anteil der Metaboliten 3-Pyridylessigsäure, 3'-Hydroxymyosmin und HPB weist dosisabhängig etliche signifikante Unterschiede auf (Tabelle 3-7). Im Gegensatz zur Ketosäure lassen sich aufgrund der kleinen Absolutwerte und der geringen Schwankungen jedoch nur schwer Schlussfolgerungen ziehen.

**Tabelle 3-7: Prozentuale Verteilung von Radioaktivität auf die Urinmetaboliten nach Gabe verschiedener Dosen  $^3\text{H}$ -Myosmin an Wistar-Ratten**

Dosis	Metaboliten in Rattenurin <sup>a</sup>			
$\mu\text{mol/kg KG}$	3-Pyridyllessigsäure	Ketosäure	3'-Hydroxymyosmin	HPB
0,001	$22,0 \pm 2,0^c$	$54,6 \pm 4,0^b$	$2,44 \pm 0,39^{bc}$	$2,3 \pm 0,1^c$
0,005	$26,1 \pm 2,0^b$	$51,5 \pm 3,9^b$	$1,68 \pm 0,45$	$1,6 \pm 0,5^d$
0,5	$24,6 \pm 0,6$	$50,0 \pm 2,1^b$	$2,04 \pm 0,26^b$	$1,9 \pm 0,9$
50	$20,2 \pm 2,6$	$63,1 \pm 2,9$	$1,55 \pm 0,23$	$3,1 \pm 0,4$

<sup>a</sup> Prozent der insgesamt durch radio-HPLC erhaltenen Radioaktivitätsmenge

<sup>b</sup> Statistisch signifikanter Unterschied zu Tieren, die 50  $\mu\text{mol/kg KG}$  erhielten,  $P < 0,05$

<sup>c</sup> Statistisch signifikanter Unterschied zu Tieren, die 0,005  $\mu\text{mol/kg KG}$  erhielten,  $P < 0,05$

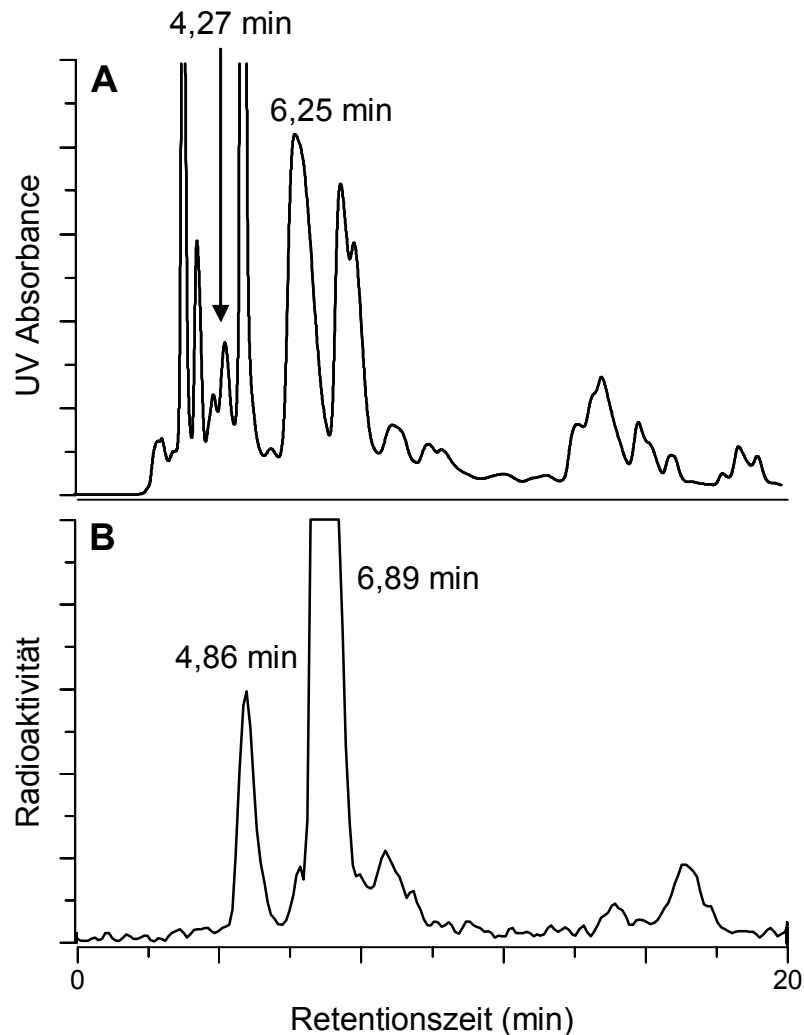
<sup>d</sup> Statistisch signifikanter Unterschied zu Tieren, die 50  $\mu\text{mol/kg KG}$  erhielten,  $P < 0,01$

### 3.3.4 Identifizierung der Metaboliten

#### 3.3.4.1 Hauptmetaboliten

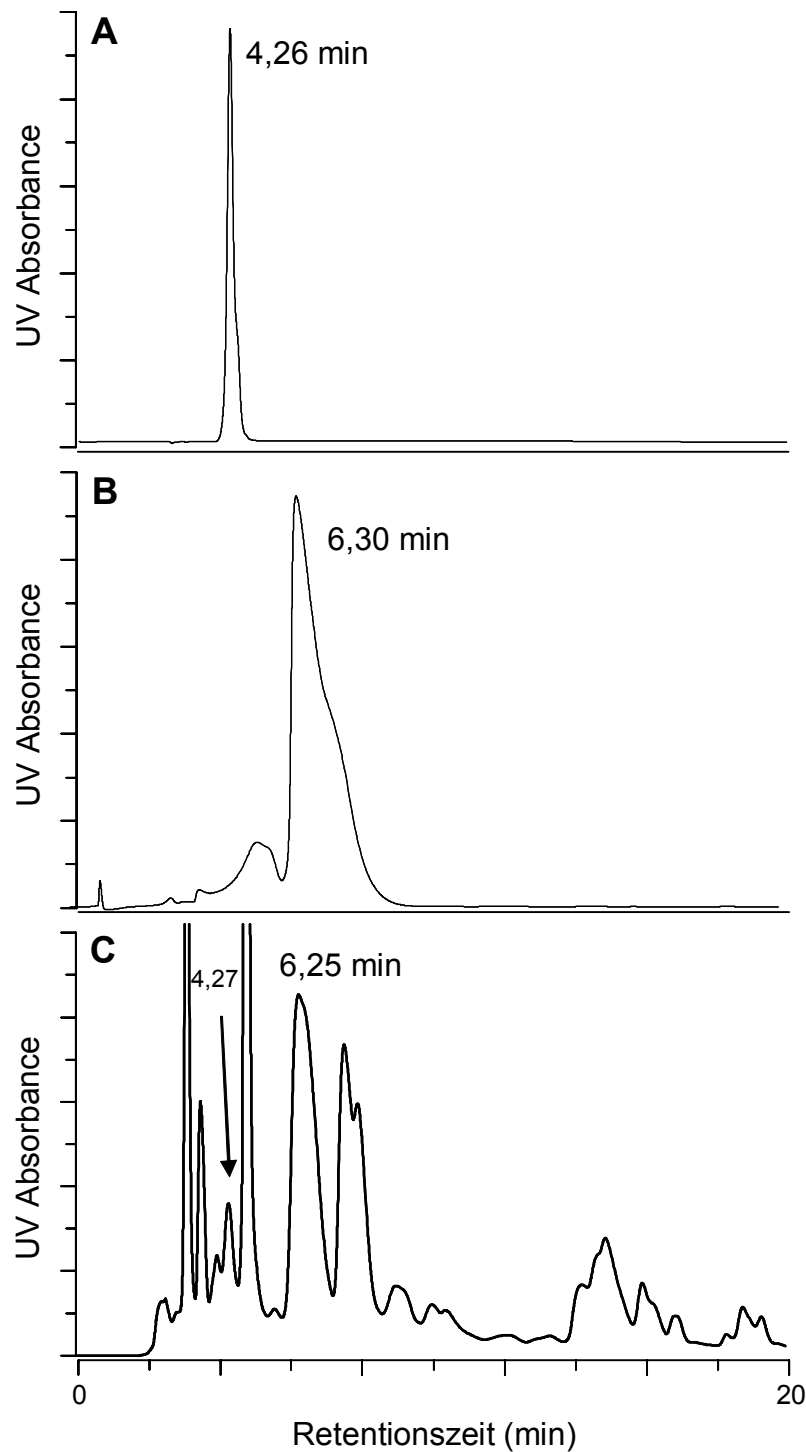
Aufgrund der kurzen Retentionszeiten von 4,3 min bzw. 6,3 min konnte unter reversed-phase-Bedingungen auf einen extrem hydrophilen Molekülcharakter der Hauptmetaboliten geschlossen werden. Um die Präsenz pH-sensibler chemischer Gruppen zu testen wurde ein Acetatpuffer mit pH 4 als mobile Phase eingesetzt. In Abhängigkeit des  $\text{pK}_\text{s}$ -Wertes entsprechender chemischer Gruppen sollten sich die Retentionszeiten der Substanzen dadurch verändern lassen. Signal 2 konnte unter diesen Bedingungen um 10 Minuten verschoben werden, wogegen das restliche Metabolitenmuster unverändert blieb. Um die Retentionszeit stärkerer Säuren zu verschieben wäre eine erneute Absenkung des pH nötig gewesen. Darauf reagierte die Chromatographie jedoch mit nicht mehr reproduzierbaren Ergebnissen. So konnte das Vorhandensein mindestens einer Carboxylgruppe für Signal 2 angenommen, für Signal 1 hingegen nur vermutet werden. Für weitere Nachweisverfahren wie UV-DAD bzw. GC/MS war eine zusätzliche Aufreinigung des Urinmaterials und vereinzelte Derivatisierungen nötig. Durch Aufbringen der Proben auf ein C18-SPE-Säulchen und fraktionierte Elution mit verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ -Mischungen konnten Lösungen mit definierter Metabolitenverteilung erhalten werden, die nur noch geringfügig verunreinigt waren. Problematisch blieb der Retentionszeitbereich bis 10 min aufgrund der Vielzahl an UV-aktiven hydrophilen Verbindungen in der ersten Urinfraktion ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  98/2). Dennoch konnten den beiden Hauptsignalen im Radiochromatogramm entsprechende UV-Signale zugeordnet werden (Abbildung 3-13). Die Retentionszeitverschiebung von circa

0,6 min ist in der verwendeten Geräteabfolge mit UV-DAD und nachgeschaltetem Radioaktivitätsdetektor begründet.



**Abbildung 3-13: Retentionszeitvergleich zwischen UV-Signalen einer Urinfraktion (A) und radio-HPLC-Signalen (B)**

Viele potenzielle Metaboliten lagen als Standardsubstanzen aus früheren Studien zum NNN- und NNK-Stoffwechsel vor. Zunächst wurden die beiden Hauptmetaboliten des NNN, Hydroxysäure und Ketosäure, in Betracht gezogen. Die Retentionszeit des Hydroxysäure-Standards entsprach keinem der radioaktiven Signale, jedoch konnte die Ketosäure einem der Urin-Peaks zugeordnet werden (Abbildung 3-14).

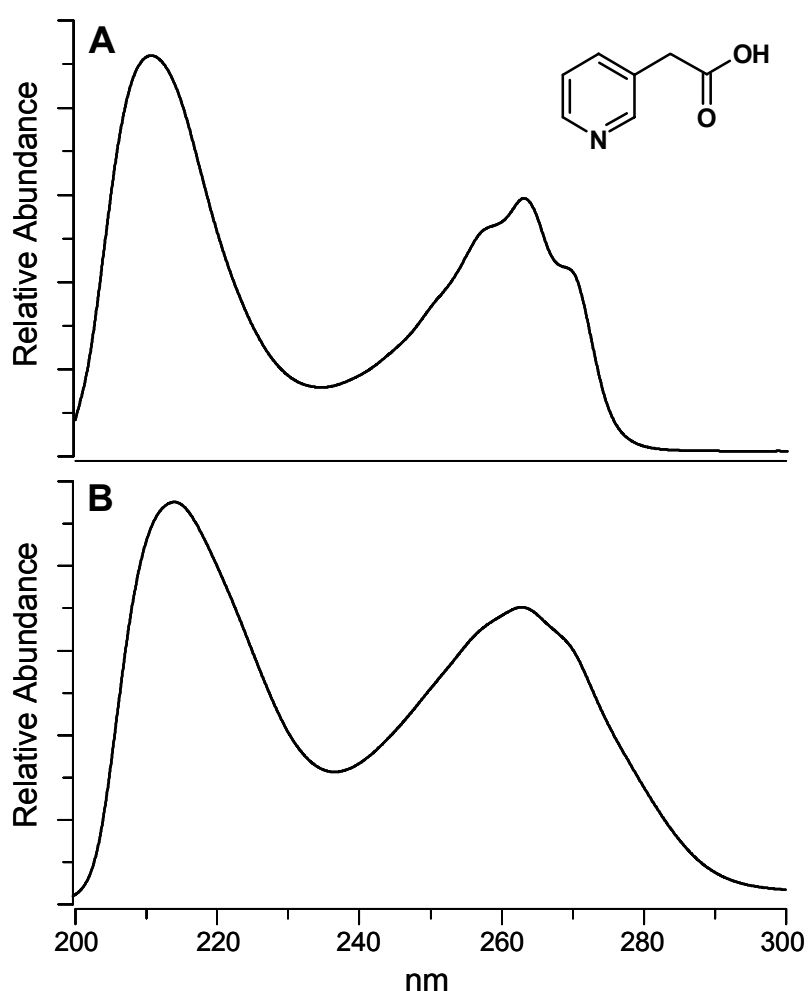


**Abbildung 3-14:** UV-Retentionszeitvergleich eines 3-Pyridylelessigsäure-Standards (A) und eines Keto-säure-Standards (B) mit Daten einer Urinfraktion (C)

Die Substanz, welche in Abb. 3-12 Signal 1 repräsentiert, sollte aufgrund der bisher erhaltenen Erkenntnisse stark hydrophil sein und eventuell ein geringes Molekulargewicht aufweisen. Ein erster Verdacht fiel auf die Nikotinsäure als kleines und relativ acides Molekül. Die Verbindung eluierte jedoch 0,5 min zu früh von der Säule. Schließlich wurde

die unter anderem aus dem Nikotinstoffwechsel bekannte 3-Pyridylelessigsäure untersucht. Die zusätzliche Methylengruppe bewirkte eine Retentionszeitverschiebung auf 4,26 min (Abbildung 3-14).

Der Vergleich von UV-Spektren der entsprechenden Standards mit den Signalen der Urin-Fraktion erhärtete die Vermutungen aufgrund der Retentionszeitvergleiche. Im Falle der 3-Pyridylelessigsäure ist das UV-Signal zur Retentionszeit 4,27 min selbst nach Urinfraktionierung noch so stark durch Verunreinigungen überlagert, dass die für Nikotinoide typischen dreifach aufgespaltenen zweiten bzw. dritten Absorptionsmaxima nicht so deutlich wie beim Standard hervortreten (Abbildung 3-15). Dagegen sind die Spektren von Ketosäure-Standard und dem Signal aus der Urinfraktion bei 6,25 min annähernd identisch (Abbildung 3-16).



**Abbildung 3-15:** Vergleich der UV-Spektren von 3-Pyridylelessigsäure-Standard (A) und dem Signal einer Urin-Fraktion (B) bei 4,27 min.

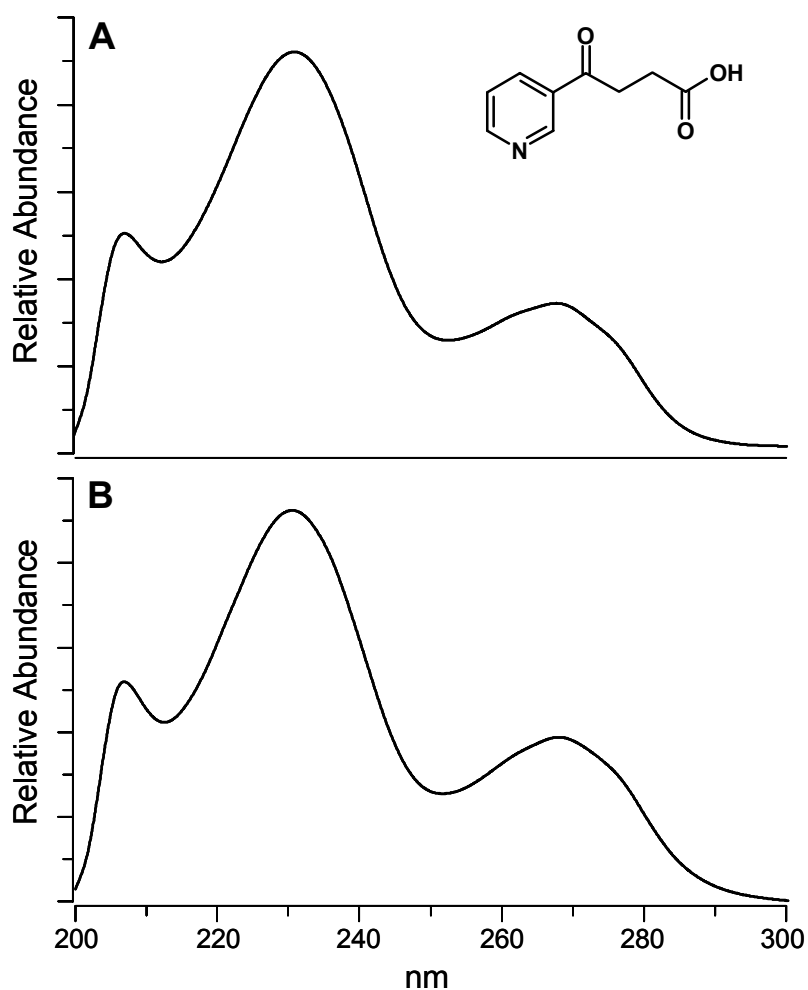
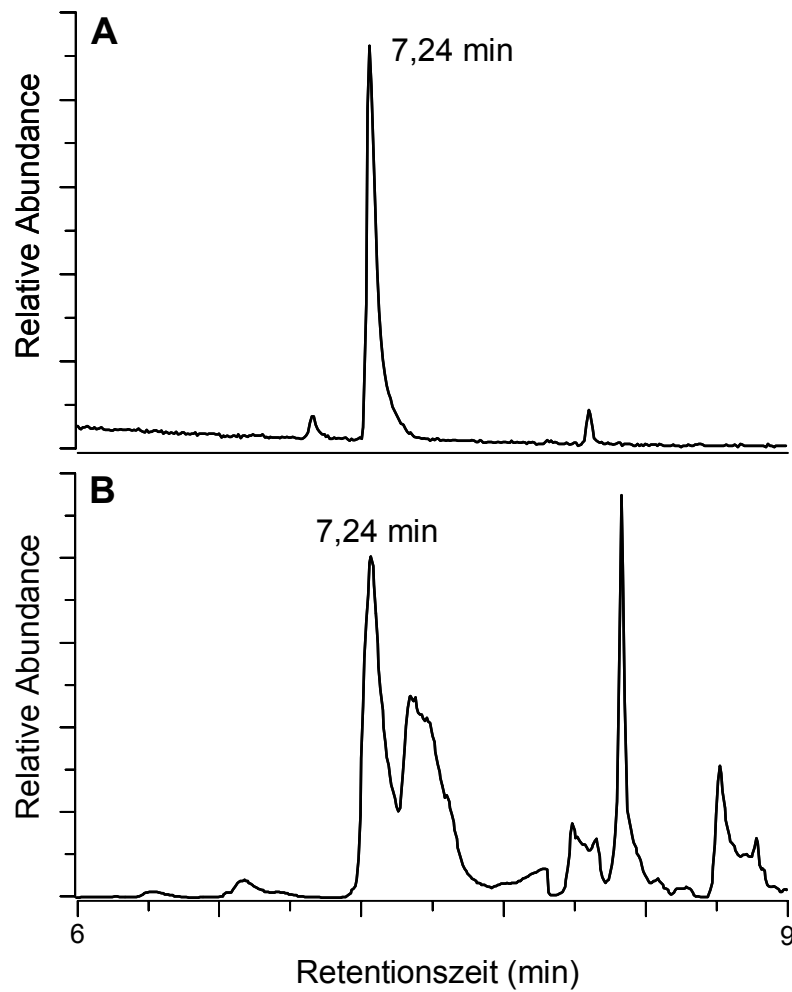


Abbildung 3-16: UV-Spektren von Ketosäure-Standard (A) und dem Signal einer Urin-Fraktion (B) bei 6,25 min.

Letzte Gewißheit erbrachten GC/MS-Messungen. Dafür mussten sowohl die Standards als auch die Urinfraktionen vorher derivatisiert werden. Die Abschirmung der Carboxylgruppen erfolgte mittels Methylierung.

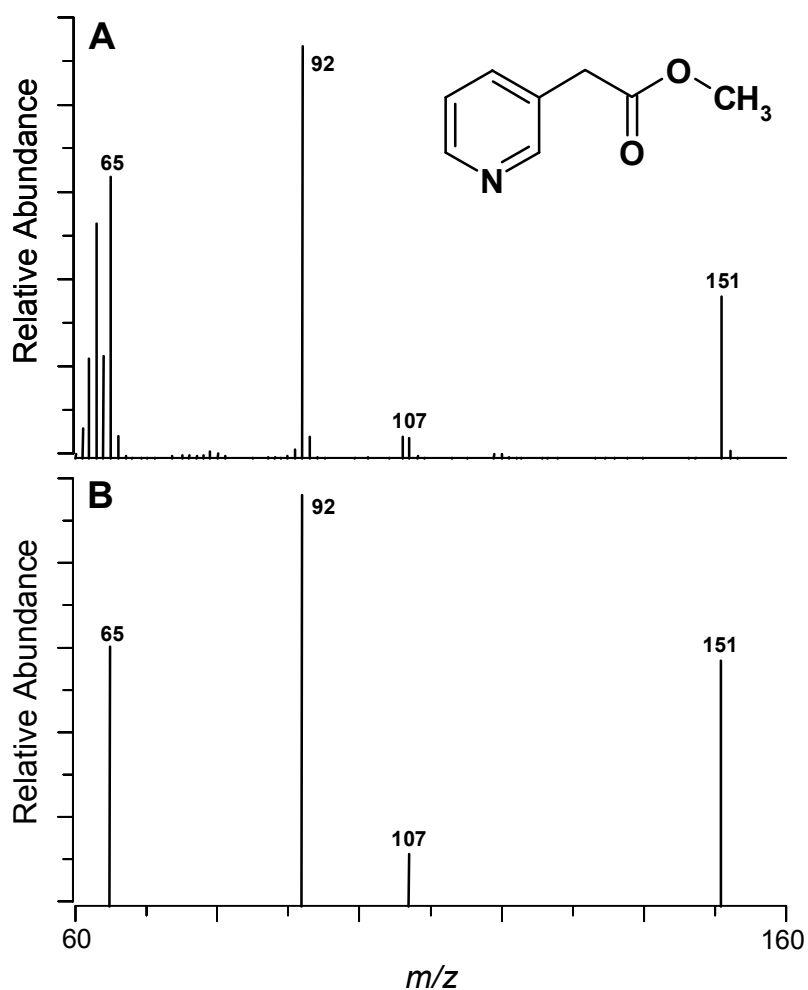
Proben des methylierten 3-Pyridylelessigsäure-Standards wurden im Scan-Modus vermessen und eluierten nach 7,24 min von der Säule. Für die methylierte Urinfraktion musste der SIM-Modus verwendet werden, da zur entsprechenden Retentionszeit diverse andere Signale aufgrund von Matrixverunreinigungen auftraten (Abbildung 3-17).





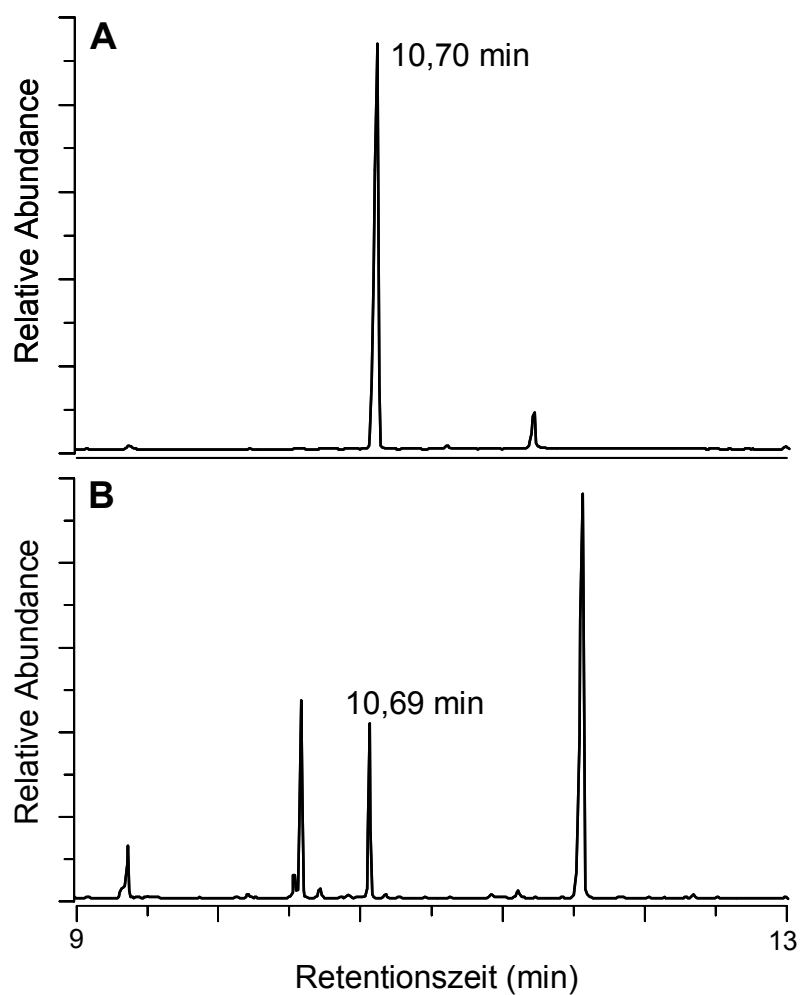
**Abbildung 3-17: GC/MS-Chromatogramme von methyliertem 3-Pyridylessigsäure-Standard (A) und einer methylierten Urinfraktion (B)**

Der Scan-Modus umfasste den Massenbereich von  $m/z$  50 bis 200. Das Massenspektrum zur Retentionszeit 7,24 min zeigt deutlich das Molekölion mit  $m/z$  151 und drei weitere charakteristische Fragmentationen mit  $m/z$  107, 92 und 65. Im SIM-Modus wurden nur diese vier Massen erfasst. Die relativen Intensitäten der Massenspuren sind sowohl für die Messungen im Scan- als auch im SIM-Modus nahezu identisch (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18:** Massenspektrum von methyliertem 3-Pyridyllessigsäure-Standard (A) mit dem Molekülion  $m/z$  151 und den charakteristischen Massenfragmenten  $m/z$  107, 92 und 65. Im SIM-Modus aufgenommenes Massenspektrum einer methylierten Urinfraktion zur Retentionszeit 7,24 min (B). Die relativen Intensitäten der gewählten Massenspektren entsprechen denen der Standardmessung.

Die gleiche Vorgehensweise wurde auch für die Identifizierung der Ketosäure angewendet. Für diese Verbindung war es jedoch möglich GC/MS-Messungen nicht nur für den Standard, sondern auch für methylierte Urinfraktionen im Scan-Modus durchzuführen. Der methylierte Ketosäure-Standard verlässt die GC-Säule nach einer Retentionszeit von 10,70 min. Das GC/MS-Chromatogramm einer methylierten Urinfraktion zeigt ein entsprechendes Signal nach 10,69 min. Beide Proben erzeugen bei der Messung nur wenige Fremdsignale, von denen keines zur relevanten Retentionszeit co-eluiert (Abbildung 3-19).



**Abbildung 3-19: GC/MS-Chromatogramme von methyliertem Ketosäure-Standard zur Retentionszeit 10,70 min (A) und einer methylierten Urinfraktion (B). Beide Chromatogramme resultieren aus Messungen im Scan-Modus ( $m/z$  50 bis 200).**

Das Massenspektrum von methyliertem Ketosäure-Standard (Retentionszeit 10,70 min) zeigt das Molekülion mit  $m/z$  193 sowie weitere Fragmentionen mit hoher relativer Intensität, wie  $m/z$  162, 134, 106, 78 und 51. Diese Ionen finden sich auch im Massenspektrum des Signals mit Retentionszeit 10,69 min der methylierten Urinfraktion wieder (Abbildung 3-20).

Bei diesen Messungen wurde kein Background-Abzug durchgeführt, was die leicht abweichenden relativen Intensitäten einiger Massenfragmente insbesondere im Massenbereich  $m/z < 100$  erklärt.

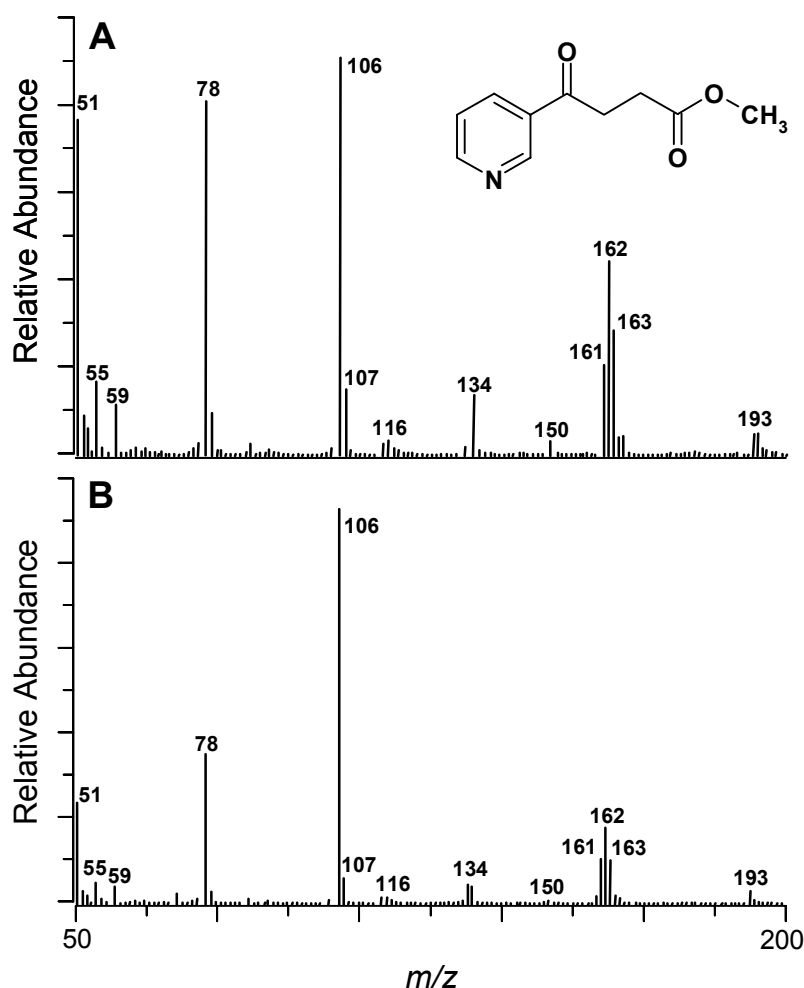
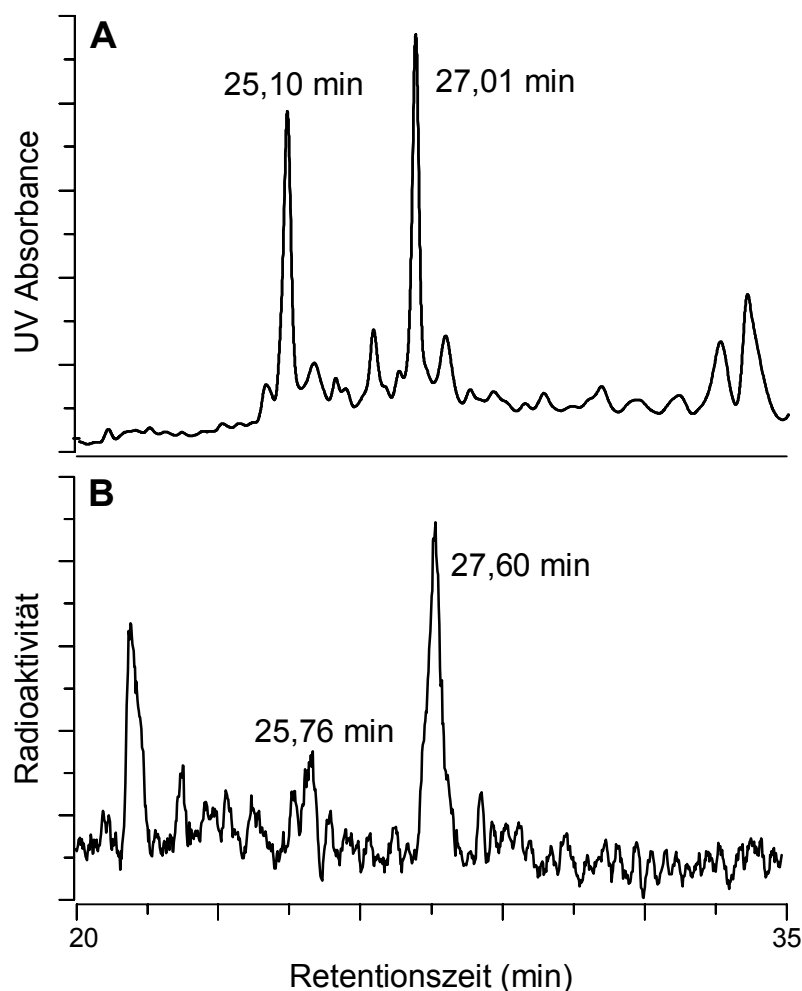


Abbildung 3-20: Massenspektren von methyliertem Ketosäure-Standard (A) und einer methylierten Urinfraction (B), beide aus Messungen im Scan-Modus. Sowohl das Molekülion mit  $m/z$  193 als auch die weiteren Fragmentationen aus dem Standardlauf finden sich auch im Spektrum des Signals mit Retentionszeit 10,69 min der methylierten Urinfraction.

#### 3.3.4.2 Weitere Metaboliten

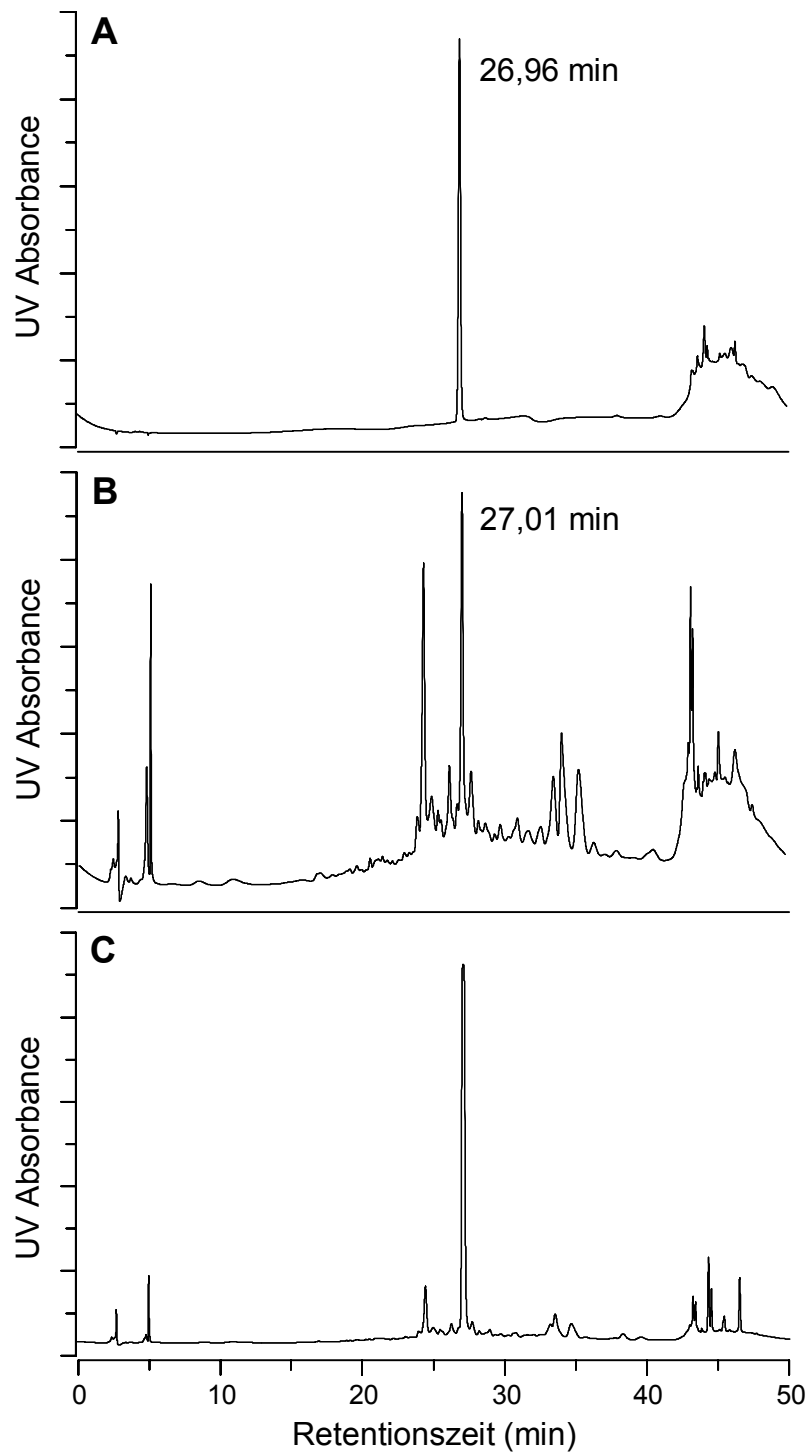
Die Radiochromatogramme, welche nach Scintillator-Zumischung erhalten wurden, zeigen noch deutliche Signale im Bereich von 18 bis 30 Minuten. Da diese Signale nur geringe Intensitäten aufwiesen, war ihre Detektion nach Wechsel des HPLC-Systems, der wegen besserer Eignung für Identifizierungsaufgaben angezeigt war, äußerst schwierig. Das System bot zwar nun die Möglichkeit einer UV/DAD-Detektion, jedoch auf Kosten einer geringeren Nachweisempfindlichkeit für Radioaktivität durch Verwendung eines Detektors mit Feststoffzelle. Abhilfe konnte zum Teil eine Aufkonzentration des Urins mittels Vakuum-concentrators schaffen. Dennoch war es nicht möglich alle Signale auf die gewohnte Weise zu erfassen. So erhebt sich der Peak bei 25,76 min nur sehr schwach über das Untergrund-rauschen. Aufgrund von Vergleichen mit Messungen nach Scintillator-Zumischung wurde

dieses Signal schließlich doch zum Retentionszeitvergleich herangezogen. Verglichen wurde mit UV-Signalen von Läufen der Urinfraktion H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 92/8 (Abbildung 3-21).



**Abbildung 3-21:** Retentionszeitvergleich zwischen UV-Signalen einer Urinfraktion (A) und radio-HPLC-Signalen (B). Das schwache Signal bei 25,76 min resultiert aus der Verwendung eines radio-HPLC-UV/DAD-Systems mit einem Radioaktivitätsdetektors ohne Scintillator-Zumischung.

Auch für dieses Retentionszeitfenster existieren diverse bekannte Metaboliten, die in Standardläufen gegengetestet wurden. Lediglich HPB zeigte eine dem Signal 4 entsprechende Retentionszeit von 26,96 min. Um eventuelle Matrixeffekte auf die Retentionszeit auszuschließen wurde ein Aliquot der Urinfraktion mit einer wässrigen HPB-Lösung versetzt. Das UV-Chromatogramm zeigte daraufhin ein singuläres Signal bei 27 min mit entsprechend größerer Fläche (Abbildung 3-22).



**Abbildung 3-22: UV-Chromatogramme von HPB-Standard (A), einer Urinfraktion (B) und der Urinfraktion nach Zusatz einer HPB-Standard-Lösung (C)**

Ein Vergleich der UV-Spektren einer HPB-Standardlösung mit dem Signal der Urinfraktion bei 27 min ist in Abbildung 3-23 dargestellt. Der leicht unsaubere Kurvenverlauf des Spektrums der Urinfraktion ist auch hier auf Signal-Überlagerungen durch die stets präsente Urinmatrix zurückzuführen.

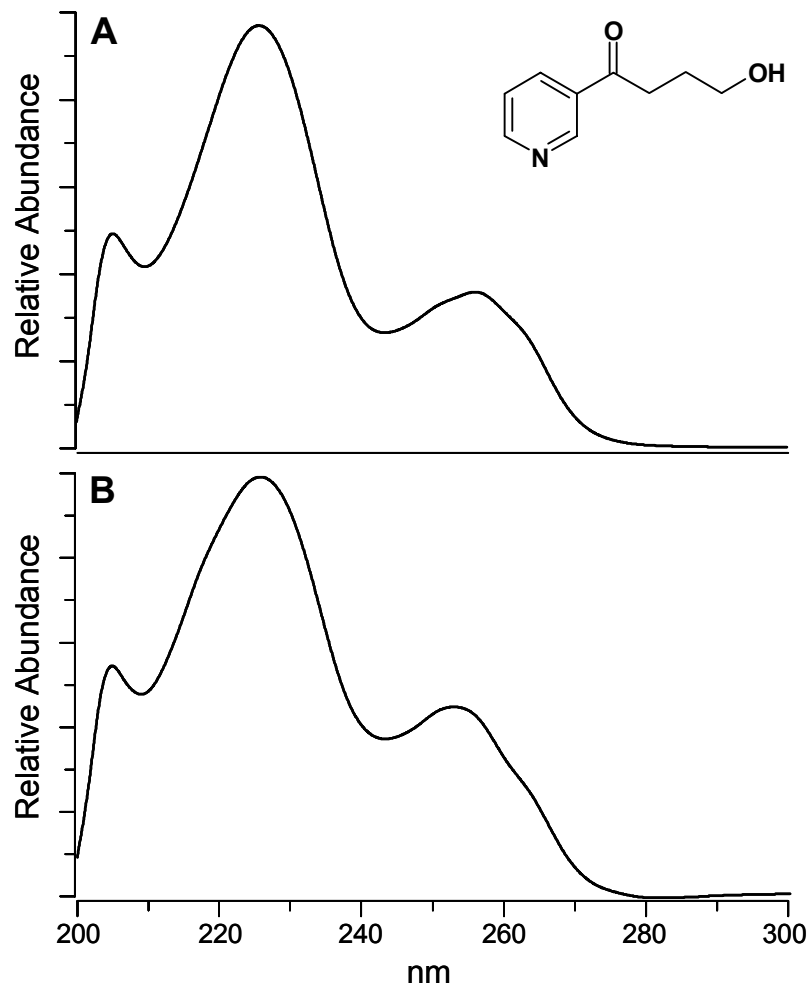
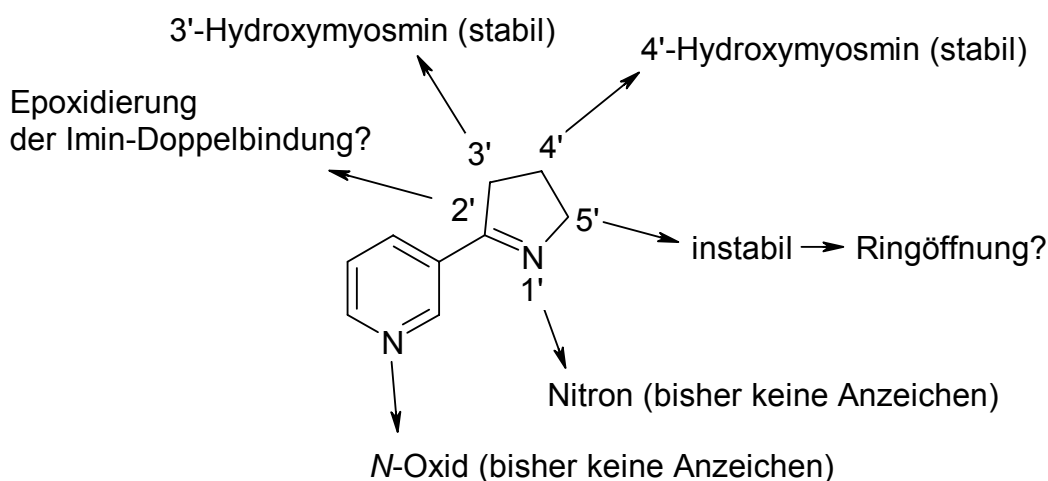


Abbildung 3-23: UV-Spektren von HPB-Standard (A) und dem Signal einer Urinfraktion bei 27,0 min (B)

Für das UV-Signal bei 25,10 min ließ sich mit dieser Vorgehensweise keine Entsprechung unter den bereits bekannten Nikotinoid-Metaboliten finden. Aus Metabolismusstudien anderer Nikotinoide ist bekannt, dass ein erster metabolischer Aktivierungsschritt häufig die Oxidation des Moleküls darstellt. Dies kann unter anderem durch Hydroxylierung, Epoxidierung von Doppelbindungen oder durch Bildung von *N*-Oxiden geschehen. Letzteres kann in beiden Ringsystemen stattfinden. Dagegen ist eine *in vivo* Aktivierung des Nikotinoid-Pyridinrings durch Hydroxylierungen und Epoxidierungen nicht bekannt. Das Myosmin ist aufgrund seiner Iminstruktur einzigartig unter den bekannten Nikotinoiden und bietet dadurch eventuell neue Metabolismuswege, die den anderen Vertretern nicht offen stehen. Eine Übersicht oxidativer Aktivierungsmöglichkeiten ist in Abbildung 3-24 gegeben. Darunter befinden sich auch Wege, für die es bisher keine eindeutigen Beweise gibt.



**Abbildung 3-24: Mögliche oxidative Aktivierungswege *in vivo***

Aufgrund dieser Überlegungen wurde zunächst 4'-Hydroxymyosmin synthetisiert und sowohl die Retentionszeit als auch das UV-Spektrum mit den Signalen der Urinfraktion verglichen. 4'-Hydroxymyosmin konnte als singuläres Signal mit einer Retentionszeit von 24,35 min detektiert werden. Sein UV-Spektrum mit Absorptionsmaximas bei circa 235 und 270 nm ähnelt dem des Myosmins (Abbildung 3-25). Die Retentionszeit des Standards lag jedoch etwa 0,5 min vor der Zeit des UV-Signals der Urinfraktion.

Die Synthese von 3'-Hydroxymyosmin erfolgte direkt aus Myosmin als Edukt über eine bromierte Zwischenstufe. HPLC-Läufe ergaben ein sauberes Signal mit Retentionszeit 24,99 min. Ein weiterer Lauf, nach Zusatz von 4'-Hydroxymyosmin, zeigte einen Retentionszeitunterschied der beiden Verbindungen von etwa 0,6 min (Abbildung 3-26). Diese Differenz könnte auf eine geringfügig stärkere sterische Abschirmung der Hydroxygruppe an der 3'-Stelle durch den Pyridinring zurückgeführt werden. Daraus resultiert eine schwächer ausgeprägte Hydrophilie des Moleküls und damit eine verlängerte Retentionszeit.

Ein Spektrenvergleich von 3'-Hydroxymyosmin und 4'-Hydroxymyosmin ergab identische UV-Spektren.



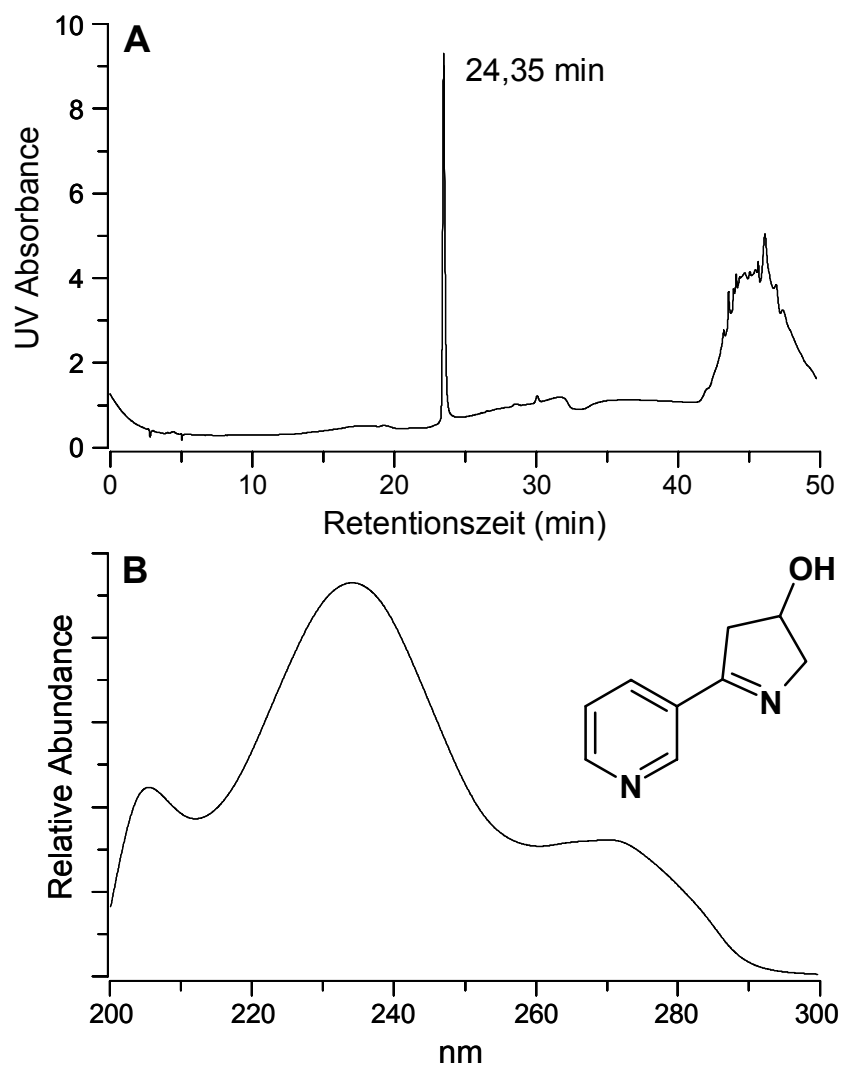


Abbildung 3-25: UV-Chromatogramm und UV-Spektrum von 4'-Hydroxymyosmin-Standard. Die Retentionszeit beträgt 24,35 min.

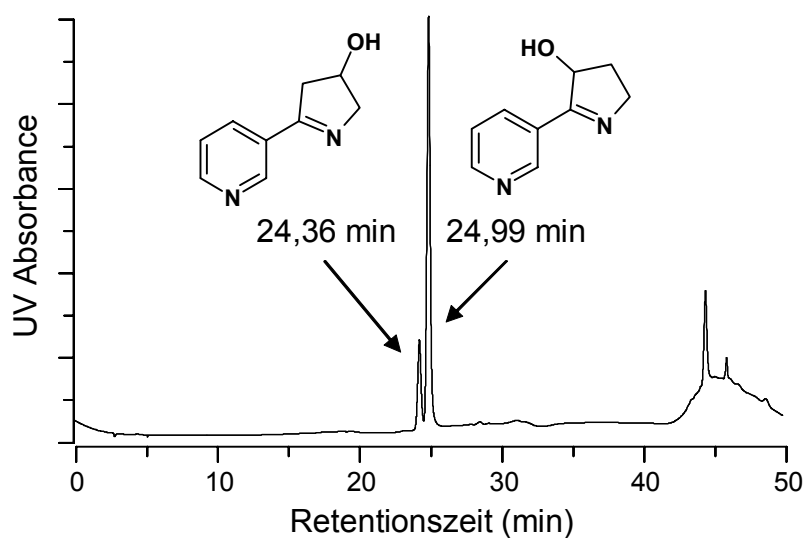
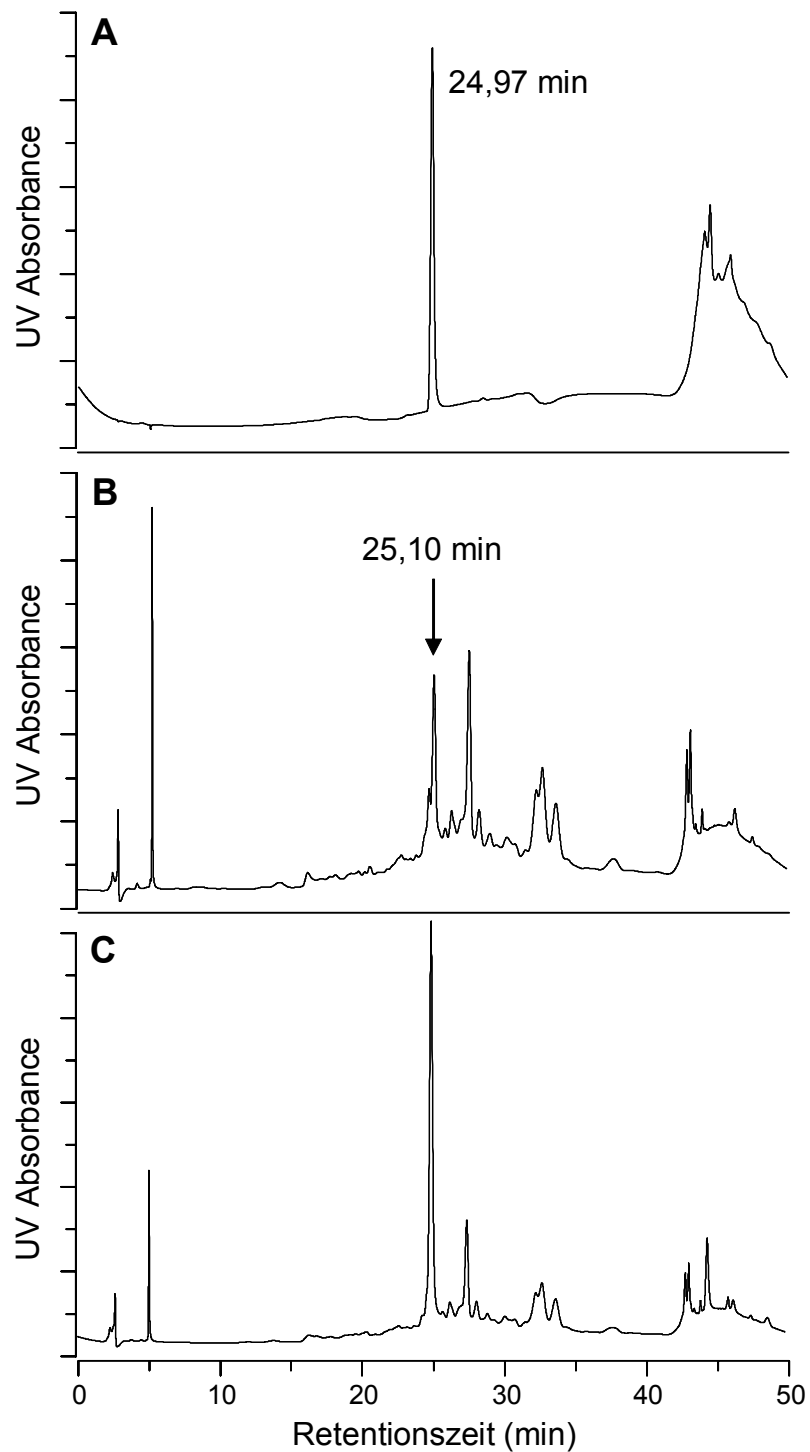


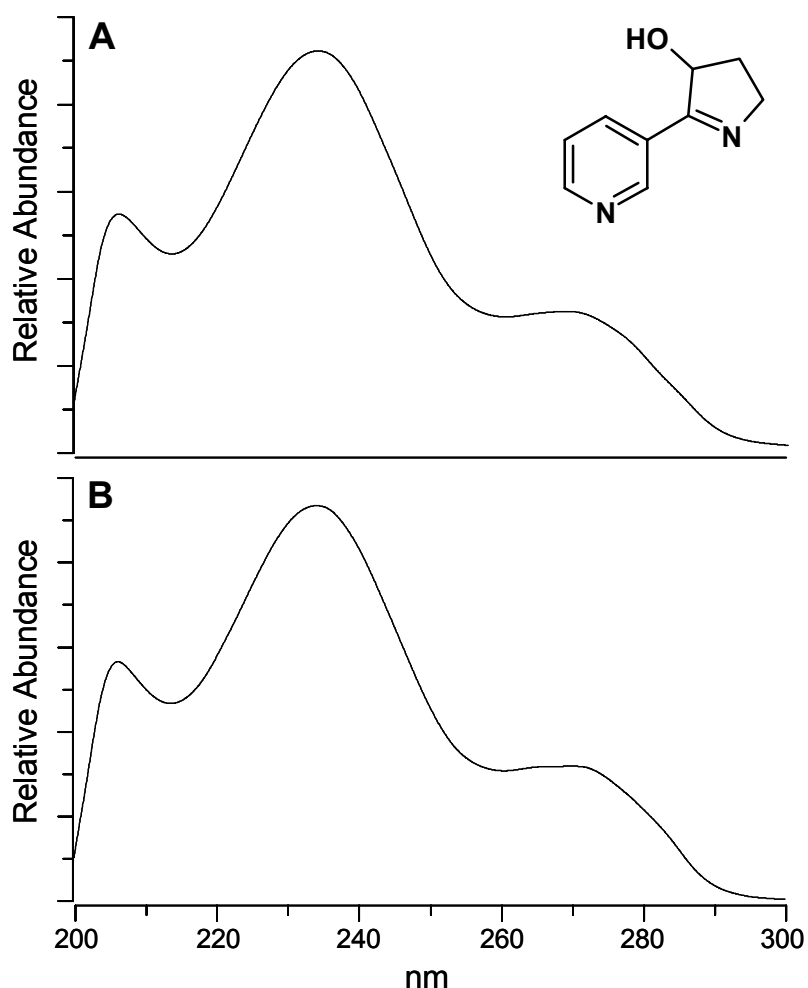
Abbildung 3-26: Retentionszeitvergleich von 3'-Hydroxymyosmin (rechts) und 4'-Hydroxymyosmin (links)

Abbildung 3-27 zeigt den Vergleich der Retentionszeiten von 3'-Hydroxymyosmin-Standard und dem Signal einer Urinfraktion bei 25,10 min. Nach Spiken der Urinfraktion mit einer wäßrigen Standardlösung erhöht sich selektiv die Fläche des Signals bei 25 min.



**Abbildung 3-27: UV-Chromatogramme von 3'-Hydroxymyosmin-Standard (A), einer Urinfraktion (B) und der Urinfraktion nach Zusatz einer 3'-Hydroxymyosmin-Standard-Lösung (C)**

Sowohl das UV-Spektrum von 4'-Hydroxymyosmin als auch das von 3'-Hydroxymyosmin hätte ungeachtet der Retentionszeitunterschiede dem UV-Spektrum des Signals der Urinfraktion entsprochen (Abbildungen 3-25 und 3-28).



**Abbildung 3-28: Vergleich der UV-Spektren von 3'-Hydroxymyosmin-Standard (A) und des Signals einer Urinfraktion bei 25,10 min (B)**

LC/MS Messungen sollten letzte Gewissheit über die Entstehung von 3'-Hydroxymyosmin im Metabolismus von Myosmin bei Ratten bringen. Nach Elektrosprayionisation einer Standardlösung und eines Extraktes der Urinfraktion konnten jeweils Molekülonen  $m/z$  163 ( $M+1$ ) detektiert werden (Abbildung 3-29).

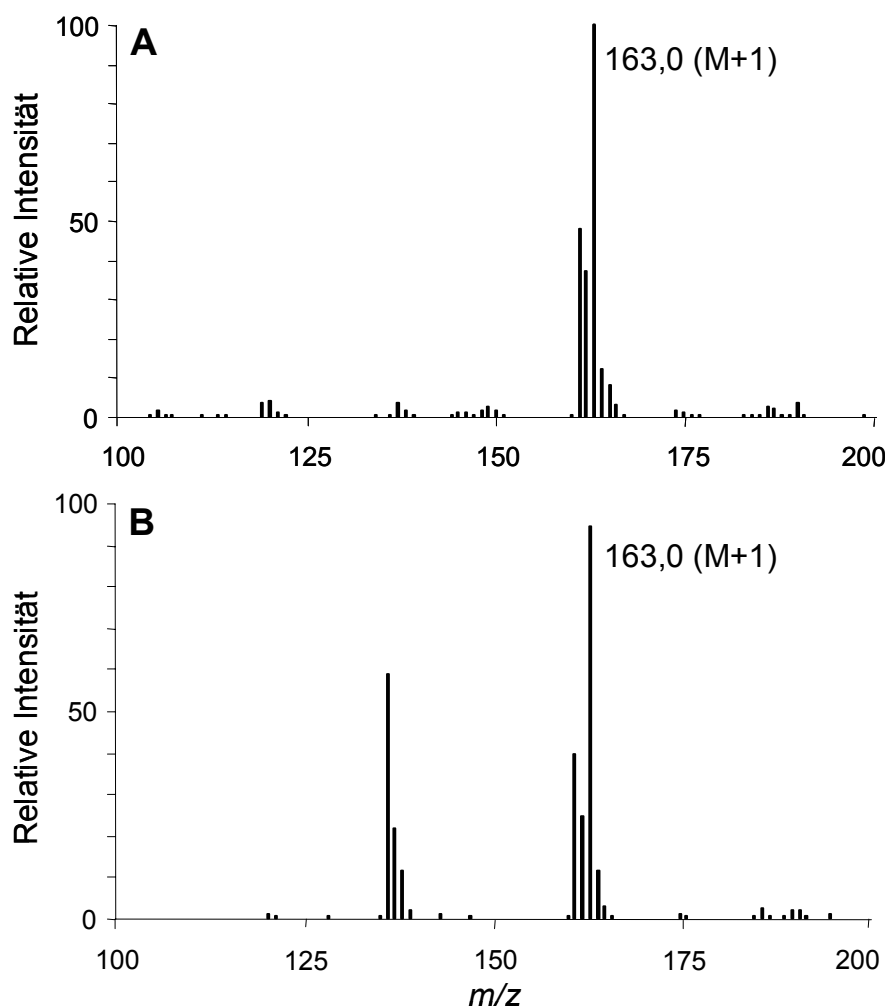


Abbildung 3-29: Massenspektren (LC/MS-ESI positiv) von 3'-Hydroxymyosmin-Standard (A) und einer Urinfraktion (B) zeigen beide das Molekölion der Masse  $m/z$  163 ( $M+1$ )

Weitere bislang noch nicht identifizierte Signale konnten selektiv in den Urinfraktionen  $H_2O/CH_3CN$  96/4 und 94/6 angereichert werden. Die UV-Chromatogramme dieser Fraktionen liefern Signale, deren UV-Spektren typischen Nikotinoid-Spektren ähneln und deren Retentionszeit mit Signalen der entsprechenden Radiochromatogramme korrelieren.

### 3.4 Einfluss von Nikotin, Cotinin und PEITC auf den NNN-Metabolismus

#### 3.4.1 Versuchsdurchführung und Gewinnung von Urin und Faeces

Für diese Versuche wurde NNN subcutan verabreicht. Im Gegensatz zu Myosmin ist bei NNN eine Hauptaufnahmequelle der Tabakrauch. Daher ist der primäre Aufnahmeort von NNN die Lunge, welche bei subcutaner Gabe des NNN über den venösen Kreislauf ebenfalls

als erstes erreicht wird. Da die Verabreichung von radioaktivem NNN per Inhalation nicht praktikabel ist, stellt die subcutane Gabe somit die nächstbeste Alternative dar. Die subcutane Applikation der Stoffe verlief bei allen Tieren ohne Probleme, so dass der gewonnene Urin und Faeces von jeweils acht Tieren jeder Gruppe für die Analysen zur Verfügung stand. An jedem Versuchstag fielen etwa 10 ml Urin/Tier an. Bei einer Ratte der Nikotin-Gruppe und einem Tier der Cotinin-Gruppe konnte eine Verdünnung des Urins durch Trinkwassereintrag festgestellt werden. Die Messungen wurden dadurch nicht beeinträchtigt. Der über 24 h gesammelte Faeces wies keine oder nur geringe und leicht zu entfernende Kontaminationen durch Futtermittel auf.

### 3.4.2 Ausscheidung der Radioaktivität über Urin und Faeces

Von der applizierten Dosis wurden nach 48 h insgesamt  $97,4 \pm 19,5\%$  in Urin und Faeces wiedergefunden, wobei der Faeces nur während der ersten 24 h gesammelt und ausgewertet wurde. In den ersten 24 h wurden zwischen  $84,5 \pm 11,8\%$  und  $90,4 \pm 2,0\%$  der gesamt nachgewiesenen Radioaktivität über den Urin ausgeschieden. Am zweiten Tag entfielen zwischen  $2,8 \pm 0,6\%$  und  $6,4 \pm 3,9\%$  der Radioaktivität auf den Urin. Die Ausscheidung über Faeces umfasste nach 24 h zwischen  $6,7 \pm 1,8\%$  und  $12,3 \pm 11,7\%$  der nachgewiesenen Radioaktivität (Tabelle 3-8).

**Tabelle 3-8:** Elimination von  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-NNN}$  bzw. seiner Metaboliten über Urin und Faeces bei F344-Ratten (MW  $\pm$  SD, n = 8)

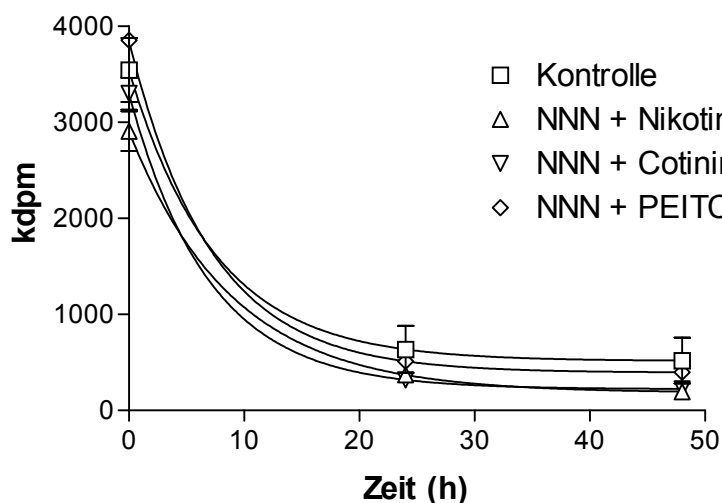
Gruppe	Urin <sup>a</sup>			Faeces <sup>a</sup>	Gesamt <sup>b</sup>
	0-24 h	24-48 h	0-48 h	0-24 h	0-48 h
Kontrolle	$84,5 \pm 11,8$	$3,2 \pm 1,7$	$87,7 \pm 11,7$	$12,3 \pm 11,7$	$101,5 \pm 27,1$
NIC	$86,7 \pm 5,4$	$6,4 \pm 3,9$	$93,1 \pm 2,4$	$6,9 \pm 2,4$	$83,3 \pm 16,7$
COT	$90,4 \pm 2,0$	$2,8 \pm 0,6$	$93,3 \pm 1,8$	$6,7 \pm 1,8$	$94,5 \pm 13,6$
PEITC	$86,8 \pm 4,9$	$3,0 \pm 1,1$	$89,8 \pm 4,9$	$10,2 \pm 4,8$	$110,4 \pm 6,2$

<sup>a</sup> Prozent basierend auf insgesamt ausgeschiedener Radioaktivität

<sup>b</sup> Prozent basierend auf gesamt applizierter Radioaktivität

Die Kinetik der Urinausscheidung ist in Abbildung 3-30 für alle vier Gruppen gezeigt. Die festzustellenden Unterschiede in der Ausscheidungskinetik spiegeln keinen Trend wieder, so dass letztlich kein eindeutiger Einfluss der gleichzeitig verabreichten Substanzen Nikotin,

Cotinin und PEITC auf die NNN-Ausscheidung festzustellen war. Die relativ hohen Streuungen einzelner Messwerte erlauben keine weiterführenden Aussagen.



**Abbildung 3-30: Kinetik der Ausscheidung von [5-<sup>3</sup>H]-NNN basierend auf der insgesamt in Urin und Faeces nachgewiesenen Radioaktivitätsmenge**

### 3.4.3 Metabolitenspektrum von NNN

Das Metabolitenspektrum von NNN wurde in diversen Studien bereits aufgeklärt. Daher konnte auf aufwändige Identifizierungen verzichtet werden. Co-Chromatographie mit nicht radioaktiv markierten Standards erlaubte eine Zuordnung der radioaktiven Signale durch Retentionszeitvergleich. Die Erfassung der Radiochromatogramme erfolgte nach Zumischung eines Flüssigscintillators. Nicht alle Signale konnten bekannten NNN-Metaboliten zugeordnet werden wie zum Beispiel der Peak mit Retentionszeit 17 min. Ob es sich bei dieser Verbindung um ein Konjugat handelt, ließ sich nicht mit Sicherheit beweisen. Radiochromatogramme nach  $\beta$ -Glucuronidase-Behandlung eines Urin-Aliquots zeigten keinerlei Veränderungen bezüglich der Peakflächen.

Im Metaboliten-Spektrum des NNN konnten die beiden Hauptsignale eindeutig der Hydroxy- und der Ketosäure zugeordnet werden. Auf Signale im Retentionszeitfenster 20-35 min entfielen nur geringe Radioaktivitätsmengen. Als weitere Metaboliten wurden NNN-*N*-Oxid bei ca. 22 min, Diol bei 23 min und Norcotinin bei 27 min identifiziert. Der Stoffwechsel des NNN verläuft im Gegensatz zum Myosmin nicht vollständig. Deshalb konnte auch nach 24 h noch unmetabolisiertes NNN bei einer Retentionszeit von 33 min nachgewiesen werden (Abbildung 3-31).

Der Urin des zweiten Tages wurde aufgrund der geringen Radioaktivitätsmengen nicht zur Bestimmung der Metabolitenverteilung herangezogen.

Die Verteilung der Gesamtradioaktivität auf die einzelnen Signale konnte durch Integration der Peakflächen ermittelt werden. Aus NNN entstehen als Hauptmetaboliten  $44,4 \pm 2,9\%$  Hydroxysäure und  $32,4 \pm 1,6\%$  Ketosäure. Daneben werden zu  $5,0 \pm 1,9\%$  NNN-*N*-Oxid,  $1,1 \pm 0,4\%$  Diol und  $2,3 \pm 0,7\%$  Norcotinin gebildet. An unverstoffwechseltem NNN bleiben  $4,7 \pm 1,4\%$  zurück (Tabelle 3-9).

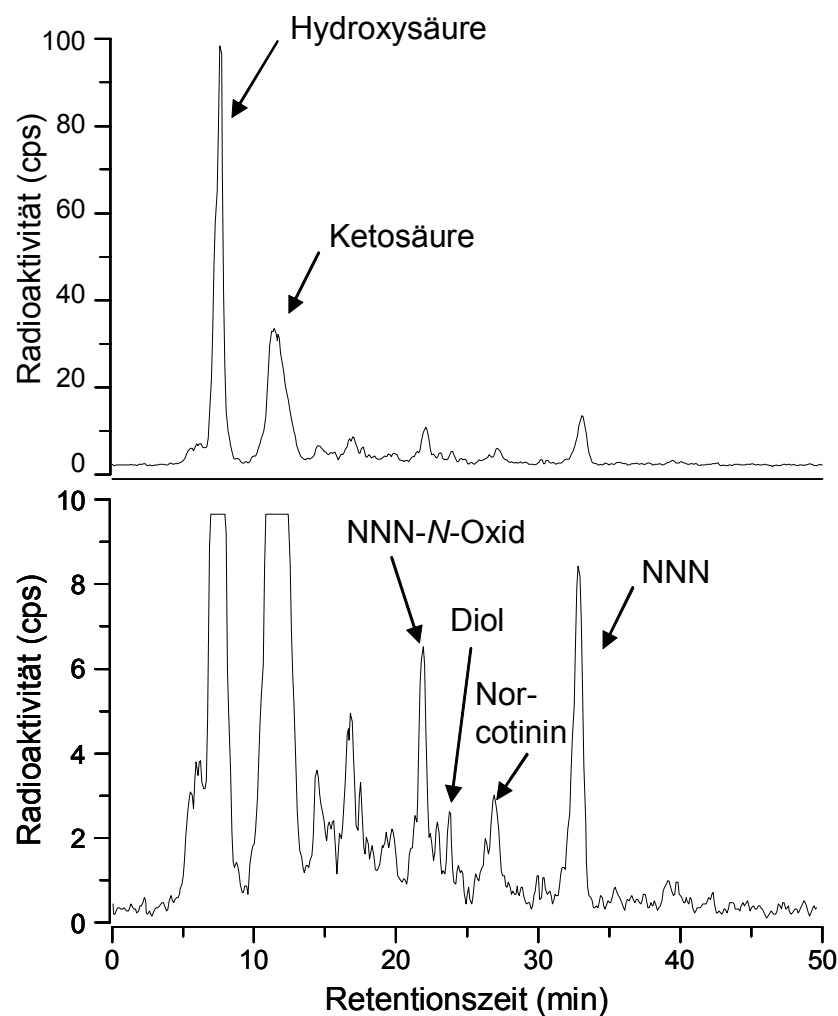


Abbildung 3-31: Radiochromatogramm von 0-24 h Urin nach Gabe von  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-NNN}$  an F344 Ratten

### 3.4.4 Veränderungen im Metabolitenspektrum durch Co-Administration von Nikotin, Cotinin und PEITC

#### 3.4.4.1 Nikotin

Gleichzeitige Gabe von Nikotin hat keinen Einfluss auf das grundlegende Erscheinungsbild der Radiochromatogramme verglichen mit den Kontrolltieren. Sowohl  $[5-^3\text{H}]\text{-NNN}$  als auch die identifizierten Metaboliten können ausgewertet werden. Abbildung 3-32 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm eines Urin-Aliquots des Zeitraums 0-24 h.

Die Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Signale zeigt teils signifikante Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollen (Tabelle 3-9). So ist ein signifikanter Anstieg der Hydroxyäure auf  $48,0 \pm 2,5\%$  (108% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ) zu verzeichnen. Damit verbunden konnte ein ebenfalls signifikanter Abfall der Ketosäure auf 86% des Kontrollniveaus beobachtet werden ( $28,0 \pm 1,9\%$ ,  $P < 0,001$ ). Nicht signifikant waren die Anstiege von NNN-*N*-Oxid auf  $5,8 \pm 1,6\%$  (116% der Kontrollen) und Diol auf  $1,4 \pm 0,4\%$  (127% der Kontrollen) sowie der verringerte Anteil an unmetabolisiertem NNN ( $4,5 \pm 2,3\%$ , 96% der Kontrollen). Dagegen wurde signifikant mehr Norcotinin gebildet ( $3,4 \pm 1,1\%$ , 148% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ).

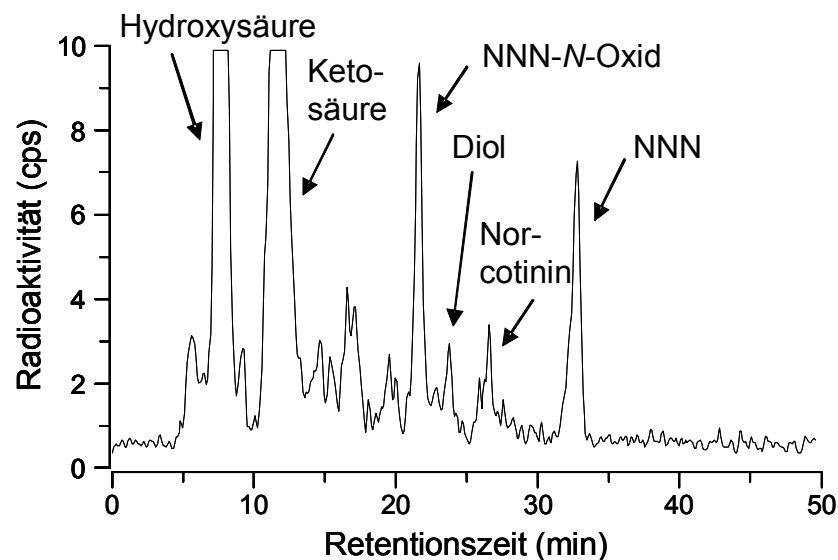


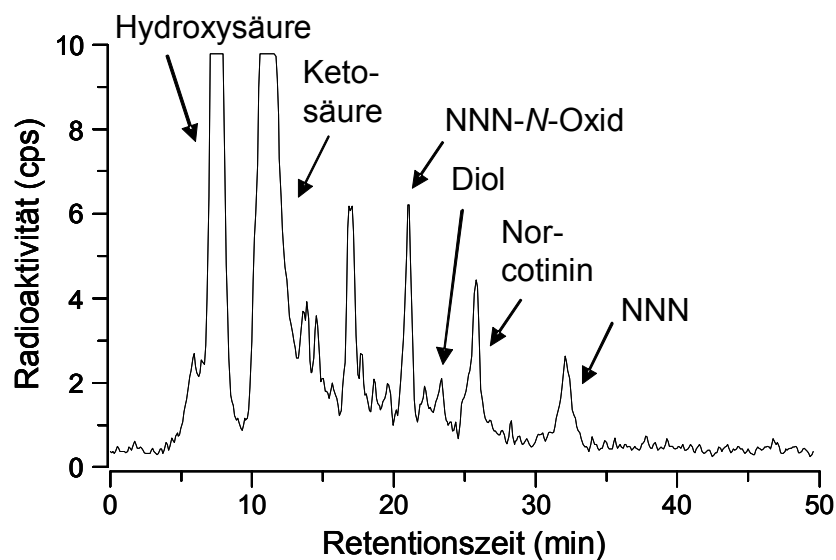
Abbildung 3-32: Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von  $[5-^3\text{H}]\text{-NNN}$  und Nikotin



#### 3.4.4.2 Cotinin

Die Co-Administration von Cotinin erlaubte ebenfalls die Auswertung aller relevanten Signale, wie Abbildung 3-33 zeigt.

Auch bei Cotinin war ein signifikanter Anstieg der Hydroxysäure ( $50,1 \pm 2,9\%$ , 113% der Kontrollen,  $P < 0,01$ ) und ein signifikanter Abfall der Ketosäure ( $29,3 \pm 1,8\%$ , 90% der Kontrollen,  $P < 0,01$ ) zu verzeichnen. Darüber hinaus konnte eine verminderte Bildung von NNN-*N*-Oxid ( $3,5 \pm 0,5\%$ , 70% der Kontrollen) und Diol ( $1,0 \pm 0,2\%$ , 91% der Kontrollen) sowie vermehrtes Auftreten von Norcotinin ( $3,3 \pm 0,5\%$ , 143% der Kontrollen,  $P < 0,01$ ) festgestellt werden. Der Anteil an nichtverstoffwechseltem NNN halbierte sich annähernd auf  $2,4 \pm 0,5\%$  (51% der Kontrollen,  $P < 0,001$ ) (Tabelle 3-9).



**Abbildung 3-33:** Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von [ $5\text{-}^3\text{H}$ ]-NNN und Cotinin

#### 3.4.4.3 PEITC

Auch die Proben der Tiere, denen neben subcutaner NNN-Gabe noch PEITC über das Futter supplementiert wurde, waren uneingeschränkt auswertbar (Abbildung 3-34).

PEITC hemmt signifikant die Bildung von Ketosäure ( $28,0 \pm 1,7\%$ , 86% der Kontrollen,  $P < 0,001$ ). Dagegen ist eine verstärkte Bildung von Hydroxysäure ( $48,1 \pm 1,6\%$ , 108% der Kontrollen,  $P < 0,01$ ) zu beobachten. Einem erhöhten Anteil NNN-*N*-Oxid ( $6,4 \pm 0,8\%$ , 128% der Kontrollen) und Norcotinin ( $3,1 \pm 0,7\%$ , 135% der Kontrollen) stehen geringere Mengen

Diol ( $0,8 \pm 0,3\%$ , 73% der Kontrollen) und NNN ( $3,2 \pm 0,5\%$ , 68% der Kontrollen) gegenüber (Tabelle 3-9).

Die ermittelten prozentualen Veränderungen auf die Bildung von NNN-Metaboliten nach Co-Administration von Nikotin, Cotinin und PEITC sind in Tabelle 3-9 zusammengestellt.

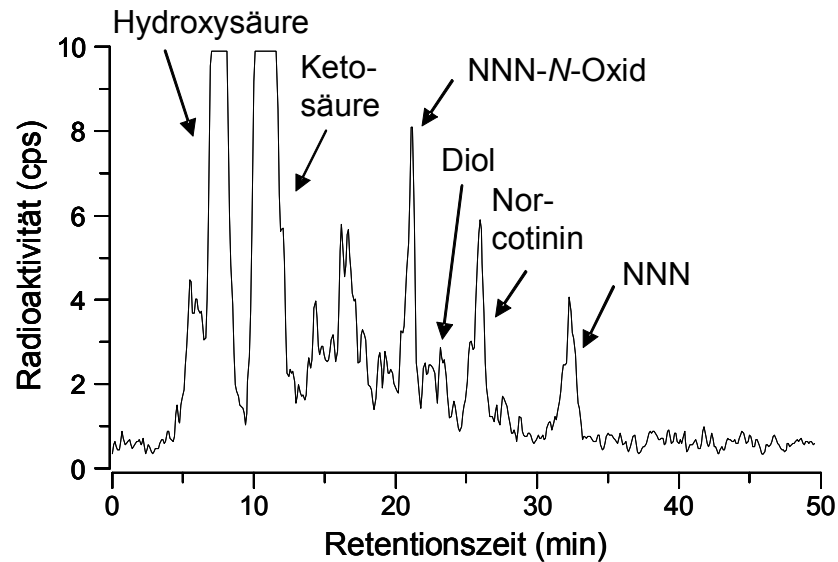


Abbildung 3-34: Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von  $[5-^3\text{H}]\text{-NNN}$  und PEITC

Tabelle 3-9: Einfluss von Nikotin, Cotinin und PEITC auf die Ausscheidung von NNN-Metaboliten in 24 h Urin (MW  $\pm$  SD; n = 8)

Metabolit	Prozent der Radioaktivität in 24 h Urin (Prozent der Kontrolle)			
	Kontrolle	NIC	COT	PEITC
Hydroxysäure	$44,4 \pm 2,9$	$48,0 \pm 2,5$ (108)*	$50,1 \pm 2,9$ (113)**	$48,1 \pm 1,6$ (108)**
Ketosäure	$32,4 \pm 1,6$	$28,0 \pm 1,9$ (86)***	$29,3 \pm 1,8$ (90)**	$28,0 \pm 1,7$ (86)***
NNN-N-Oxid	$5,0 \pm 1,9$	$5,8 \pm 1,6$ (116)	$3,5 \pm 0,5$ (70)	$6,4 \pm 0,8$ (128)
Diol	$1,1 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$ (127)	$1,0 \pm 0,2$ (91)	$0,8 \pm 0,3$ (73)
Norcotinin	$2,3 \pm 0,7$	$3,4 \pm 1,1$ (148)*	$3,3 \pm 0,5$ (143)**	$3,1 \pm 0,7$ (135)*
NNN	$4,7 \pm 1,4$	$4,5 \pm 2,3$ (96)	$2,4 \pm 0,5$ (51)***	$3,2 \pm 0,5$ (68)*

Signifikant verschieden von den Kontrollen:  $P < 0,05$  (\*);  $P < 0,01$  (\*\*);  $P < 0,001$  (\*\*\*)

### **3.5 Einfluss von Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, N'-Nitrosoanatabin und N'-Nitrosoanabasin auf den NNN-Stoffwechsel**

#### **3.5.1 Applikation und Gewinnung von Urin- und Faecesproben**

Auch bei diesem Folgeversuch verlief die subcutane Applikation problemlos, so dass je Versuchsgruppe Urin und Faeces von vier Tieren für die Analysen zur Verfügung stand.

Die Ratten produzierten in den beiden ersten 12 h jeweils zwischen 4 und 8 ml Urin. In den Zeiträumen 24-48 h und 48-72 h konnten jeweils etwa 10-18 ml Urin gewonnen werden. Faeces wurde über den Zeitraum von 72 h gepoolt und ergab circa 15-20 g je Tier. Durch Anteigen des mehlförmigen Futters mit Wasser wurde ein Verschleppen von Futter aus dem Fütterungsbereich in den Metabolismuskäfig unterbunden und somit eine Kontamination der Urin- und Faecesproben verhindert.

#### **3.5.2 Eliminationskinetik von [5-<sup>3</sup>H]-NNN**

Nach 72 h wurden insgesamt  $116,2 \pm 7,1\%$  der applizierten Radioaktivität in Urin und Faeces wiedergefunden. Der Anteil der gemessenen Radioaktivität im Urin nach 72 h lag zwischen  $91,5 \pm 1,2\%$  und  $93,8 \pm 2,2\%$ . In den Faeces betrug dieser Anteil zwischen  $6,2 \pm 2,2\%$  und  $8,5 \pm 1,2\%$ . Nach 24 h waren zwischen  $87,5 \pm 1,0\%$  und  $90,6 \pm 1,9\%$  der insgesamt über den Urin ausgeschiedenen Radioaktivität eliminiert. Am zweiten Tag lagen die entsprechenden Werte zwischen  $1,9 \pm 0,3\%$  und  $2,3 \pm 0,4\%$  (Tabelle 3-10).

Ein Tier der NAT-Gruppe zeigte eine verzögerte Radioaktivitätsausscheidung. Einem vergleichsweise niedrigen Wert in den ersten 12 h stand eine erhöhte Radioaktivitätsmenge im Zeitraum 12-24 h gegenüber. Nach 24 h lag die Ausscheidung dieses Tieres auf dem gleichen Niveau wie beim Rest der Gruppe. Daraus resultieren die erhöhten Standardabweichungen der NAT-Gruppe für die Zeiträume 0-12 h und 12-24 h.

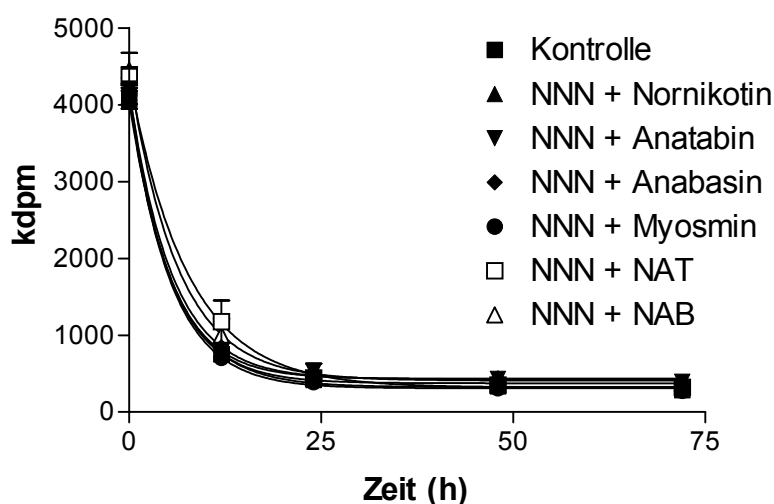
Die Ausscheidungskinetiken der verschiedenen Versuchsgruppen sind in Abbildung 3-35 dargestellt. Die Kurven verlaufen mit Ausnahme der NAT-Gruppe (Ausreisser-Tier) annähernd deckungsgleich. Somit ist kein Einfluss der zusätzlich verabreichten Substanzen auf die Elimination von [5-<sup>3</sup>H]-NNN festzustellen.

**Tabelle 3-10: Elimination von [5-<sup>3</sup>H]-NNN über Urin und Faeces nach subcutaner Applikation an F344-Ratten (MW  $\pm$  SD, n = 4)**

Gruppe	Urin <sup>a</sup>				Faeces <sup>a</sup>	Gesamt <sup>b</sup>
	0-12 h	12-24 h	24-48 h	0-72 h	0-72 h	0-72 h
Kontrolle	81,4 $\pm$ 3,8	8,2 $\pm$ 2,2	2,1 $\pm$ 0,5	93,8 $\pm$ 2,4	6,2 $\pm$ 2,4	111,8 $\pm$ 6,4
NRN	81,9 $\pm$ 3,2	7,2 $\pm$ 1,6	1,9 $\pm$ 0,3	92,7 $\pm$ 3,2	7,3 $\pm$ 3,2	114,2 $\pm$ 3,8
AT	81,3 $\pm$ 1,9	6,1 $\pm$ 1,8	2,3 $\pm$ 0,4	91,6 $\pm$ 0,6	8,4 $\pm$ 0,6	115,7 $\pm$ 3,5
AB	80,0 $\pm$ 3,6	7,6 $\pm$ 2,6	2,2 $\pm$ 0,5	91,5 $\pm$ 1,2	8,5 $\pm$ 1,2	115,6 $\pm$ 4,4
MYO	83,1 $\pm$ 2,6	7,5 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,5	93,8 $\pm$ 2,2	6,2 $\pm$ 2,2	113,8 $\pm$ 7,4
NAT	72,6 $\pm$ 14,3	17,2 $\pm$ 13,5	2,1 $\pm$ 0,6	92,9 $\pm$ 1,7	7,1 $\pm$ 1,7	120,2 $\pm$ 6,6
NAB	78,0 $\pm$ 7,1	10,2 $\pm$ 4,2	2,3 $\pm$ 0,8	92,4 $\pm$ 2,6	7,6 $\pm$ 2,6	122,3 $\pm$ 12,6

<sup>a</sup> Prozent basierend auf insgesamt ausgeschiedener Radioaktivität

<sup>b</sup> Prozent basierend auf gesamt applizierter Radioaktivität



**Abbildung 3-35: Kinetik der Ausscheidung von [5-<sup>3</sup>H]-NNN basierend auf der insgesamt in Urin und Faeces ermittelten Radioaktivitätsmenge**

### 3.5.3 Zuordnung der NNN-Metaboliten

Auch in dieser Studie wurden die NNN-Metaboliten mittels Co-Chromatographie mit nicht radioaktiv markierten Standards identifiziert. Die Radiochromatogramme wurden nach Zumischung eines Flüssigscintillators durch die Winnie-Software aufgezeichnet und die

Peakflächen automatisch integriert. Wie bereits für die vorherige Studie erwähnt, konnten auch hier nicht alle Signale bekannten NNN-Metaboliten zugeordnet werden.

Die beiden Hauptsignale im Metaboliten-Spektrum des NNN mit Retentionszeiten von etwa 8 min bzw. 11 min konnten eindeutig als Hydroxy- und Ketosäure identifiziert werden. Die Metabolitensignale zwischen 20-28 min mit nur geringer Intensität konnten NNN-*N*-Oxid bei ca. 22 min, Diol bei 23 min und Norcotin in bei 27 min zugeordnet werden. Außerdem zeigten alle Chromatogramme Signale bei etwa 34 min, die von unmetabolisiertem NNN herrühren (Abbildung 3-36). Die verschiedenen Signale der Chromatogramme traten innerhalb einer Versuchstiergruppe zu reproduzierbaren Retentionszeiten auf, was eine zuverlässige Zuordnung der Metaboliten erlaubte (Tabelle 3-11).

Urin, der später als 12 h nach Applikation gesammelt wurde konnte aufgrund der geringen Radioaktivitätsmengen nicht zur Bestimmung des Metabolitenschemas verwendet werden.

Aus der Verteilung der Gesamtradioaktivität auf die einzelnen Signale konnten folgende prozentualen Metabolitenanteile ermittelt werden: Die Hauptmetaboliten Hydroxy- und Ketosäure trugen  $44,8 \pm 2,3\%$  bzw.  $31,5 \pm 2,0\%$  zum Umsatz bei. Auf die anderen Metaboliten entfielen  $3,8 \pm 0,5\%$  auf NNN-*N*-Oxid,  $1,0 \pm 0,3\%$  auf Diol und  $1,0 \pm 0,7\%$  auf Norcotin in.  $3,2 \pm 0,5\%$  NNN wurden nicht verstoffwechselt (Tabelle 3-12).

**Tabelle 3-11: Retentionszeiten der identifizierten Metaboliten (min, MW  $\pm$  SD, n = 4)**

Gruppe	Hydroxy	Keto	<i>N</i> -Oxid	Diol	Norcotin in	NNN
Kontrolle	$8,6 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,4$	$23,4 \pm 1,7$	$25,3 \pm 1,8$	$28,5 \pm 1,2$	$37,4 \pm 2,9$
NRN	$8,8 \pm 0,1$	$12,6 \pm 0,5$	$22,3 \pm 0,1$	$24,3 \pm 0,1$	$27,6 \pm 0,2$	$35,5 \pm 0,1$
AT	$8,4 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,4$	$22,2 \pm 0,1$	$24,0 \pm 0,2$	$27,5 \pm 0,0$	$35,3 \pm 0,1$
AB	$8,3 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,4$	$21,9 \pm 0,1$	$23,8 \pm 0,2$	$27,3 \pm 0,1$	$35,0 \pm 0,1$
MYO	$8,1 \pm 0,2$	$10,8 \pm 0,6$	$21,7 \pm 0,3$	$23,4 \pm 0,6$	$26,9 \pm 0,4$	$34,6 \pm 0,7$
NAT	$8,2 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,3$	$21,8 \pm 0,1$	$23,7 \pm 0,2$	$27,3 \pm 0,1$	$35,2 \pm 0,9$
NAB	$7,9 \pm 0,1$	$10,3 \pm 0,1$	$21,6 \pm 0,1$	$23,3 \pm 0,2$	$27,1 \pm 0,1$	$34,8 \pm 0,1$

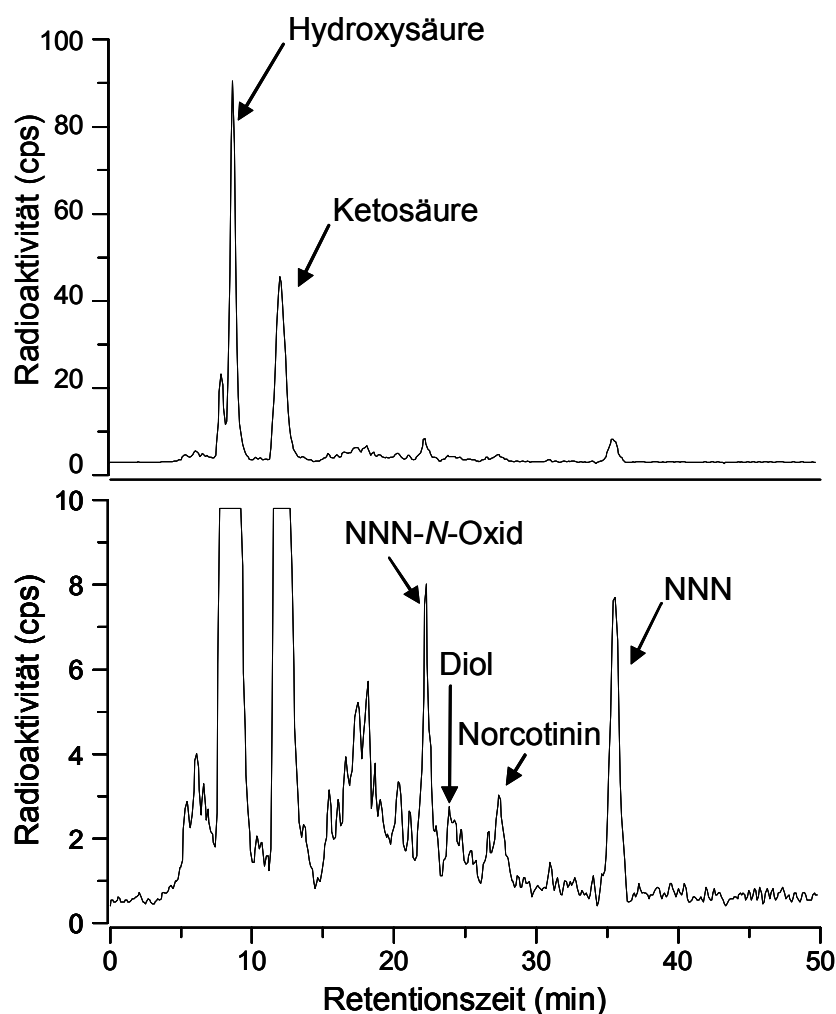


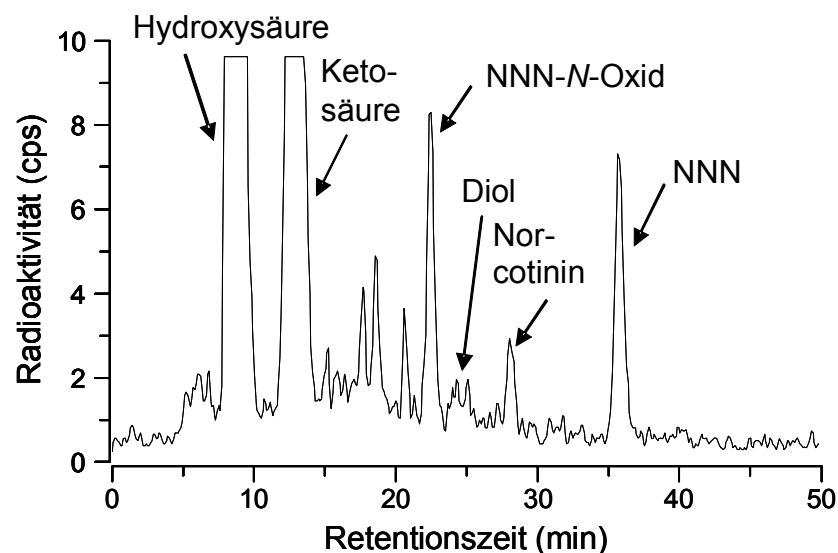
Abbildung 3-36: Radiochromatogramm eines 0-12 h Urin-Aliquots nach Gabe von  $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-NNN}$  an F344-Ratten

#### 3.5.4 Auswirkungen auf das Metabolitenspektrum von $[5\text{-}^3\text{H}]\text{-NNN}$ durch Co-Administration von Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, $N'$ -Nitrosoanatabin und $N'$ -Nitrosoanabasin

Die Auswertbarkeit der Chromatogramme wurde durch gleichzeitige Gabe der anderen Tabakalkaloide bzw. TSNA nicht beeinträchtigt. Alle Signale der Kontroll-Gruppe fanden sich auch in den Chromatogrammen der anderen Gruppen wieder, konnten identifiziert und quantifiziert werden. Zwischen den einzelnen Gruppen kam es vereinzelt zu leichten Abweichungen der Retentionszeiten. Die Standardabweichungen innerhalb einer Gruppe waren hingegen sehr gering (Tabelle 3-11).

### 3.5.4.1 Nornikotin

Abbildung 3-37 zeigt das Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots des Zeitraums 0-12 h nach Applikation von [5-<sup>3</sup>H]-NNN und Nornikotin. Gleichzeitige Gabe von Nornikotin hat einen signifikanten Einfluss auf die Radioaktivitätsverteilung der beiden Hauptmetaboliten. Der Hydroxysäure-Anteil erhöhte sich auf  $48,2 \pm 1,0\%$  (108% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ) wogegen sich der Anteil der Ketosäure auf  $27,3 \pm 0,5\%$  (87% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ) verringerte. Ebenfalls signifikant war die vermehrte Bildung von NNN-*N*-Oxid ( $4,5 \pm 0,4\%$ , 118% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ), Diol ( $1,7 \pm 0,1\%$ , 170% der Kontrollen,  $P < 0,01$ ) und der erhöhte Wert für unverstoffwechseltes NNN ( $4,3 \pm 0,2\%$ , 134% der Kontrollen,  $P < 0,01$ ). Zusätzlich konnten erhöhte Werte für Norcotinin nachgewiesen werden ( $1,7 \pm 0,3\%$ , 170% der Kontrollen) (Tabelle 3-12).



**Abbildung 3-37:** Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von [5-<sup>3</sup>H]-NNN und Nornikotin

### 3.5.4.2 Anatabin

Der Effekt von Anatabin auf den NNN-Stoffwechsel ist gering und beschränkt sich auf Metaboliten, die nur wenig zur Gesamtradioaktivität beitragen. Der prozentuale Anteil von Hydroxysäure ( $44,4 \pm 1,6\%$ , 99% der Kontrollen) und Ketosäure ( $30,9 \pm 1,2\%$ , 98% der Kontrollen) entspricht dem der Kontrolltiere. Die restlichen Metaboliten zeigten leicht erhöhte Werte: NNN-*N*-Oxid:  $4,0 \pm 0,2\%$ , 105% der Kontrollen; Diol:  $1,4 \pm 0,1\%$ , 140% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ; Norcotin:  $1,6 \pm 0,1\%$ , 160% der Kontrollen. Ebenso leicht erhöht war

mit  $3,9 \pm 0,7\%$  (122% der Kontrollen) der Anteil des nichtmetabolisierten NNN (Tabelle 3-12).

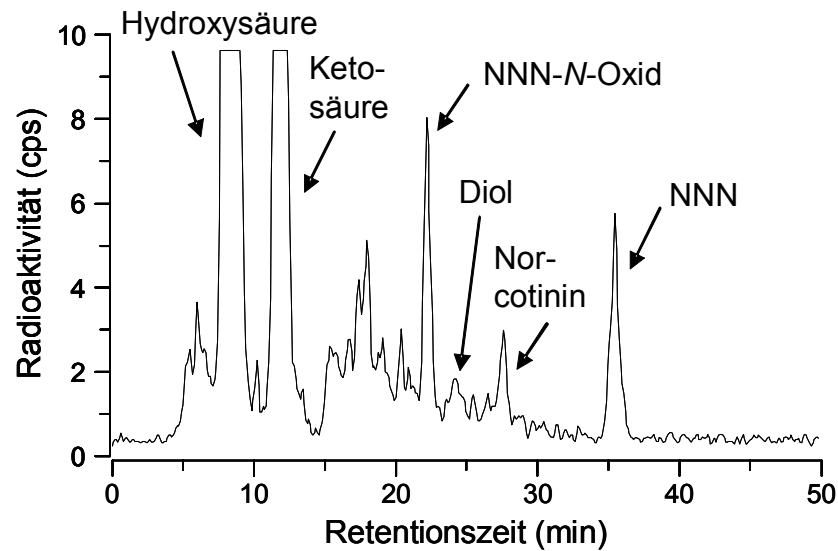


Abbildung 3-38: Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von  $[5-^3\text{H}]$ -NNN und Anatabin

#### 3.5.4.3 Anabasin

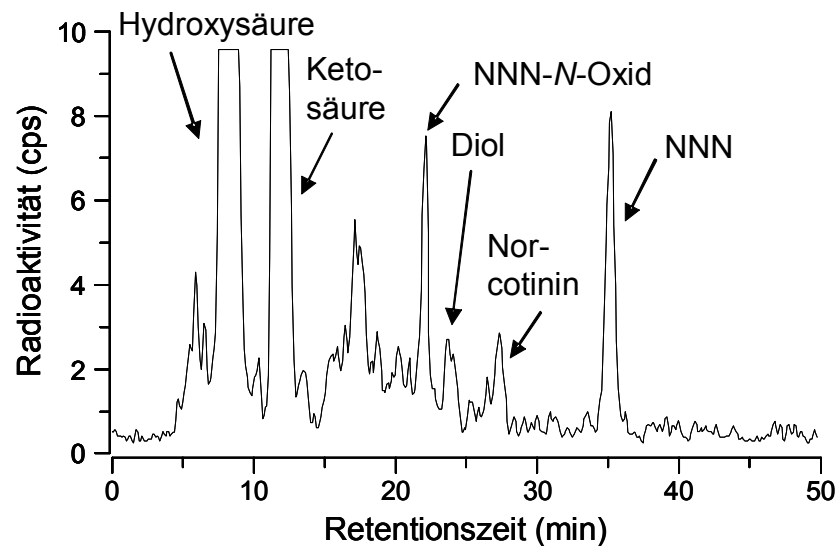


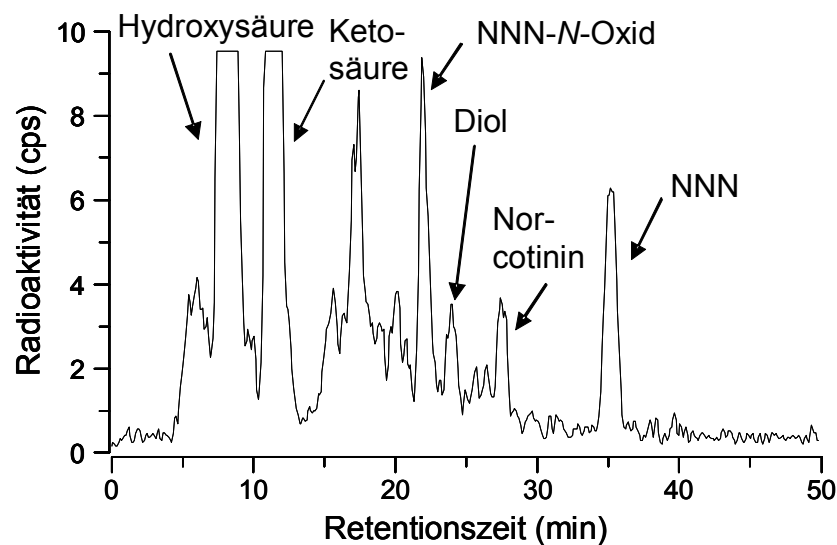
Abbildung 3-39: Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von  $[5-^3\text{H}]$ -NNN und Anabasin



Gleichzeitige subcutane Applikation von Anabasin hatte keinen Einfluss auf die Bildung von Hydroxysäure ( $44,7 \pm 1,5\%$ , 100% der Kontrollen), Ketosäure ( $31,9 \pm 1,1\%$ , 101% der Kontrollen) und NNN-*N*-Oxid ( $3,8 \pm 0,3\%$ , 100% der Kontrollen). Dagegen wurde mit je  $1,4 \pm 0,2\%$  (140% der Kontrollen) der Gesamtradioaktivität mehr Diol und Norcotin nachgewiesen. Auch der NNN-Anteil nach 12 h erhöhte sich leicht auf  $3,4 \pm 0,6\%$  (106% der Kontrollen) (Abbildung 3-39, Tabelle 3-12).

#### 3.5.4.4 *Myosmin*

Das Erscheinungsbild des Radiochromatogramms eines Urin-Aliquots 12 h nach Applikation von [5-<sup>3</sup>H]-NNN wird durch gleichzeitige Myosmin-Gabe nicht beeinflusst (Abbildung 3-40). Der prozentuale Metabolitenanteil von Hydroxysäure und Ketosäure blieb mit  $46,2 \pm 0,8\%$  (103% der Kontrollen) und  $31,4 \pm 0,4\%$  (100% der Kontrollen) nahezu unverändert. Diol und Norcotin fanden sich zu je  $1,3 \pm 0,1\%$  (130% der Kontrollen) wieder, wogegen sich die Anteile an NNN-*N*-Oxid und NNN mit  $3,6 \pm 0,2\%$  (95% der Kontrollen) und  $2,9 \pm 0,2\%$  (90% der Kontrollen) leicht verringerten (Tabelle 3-12).

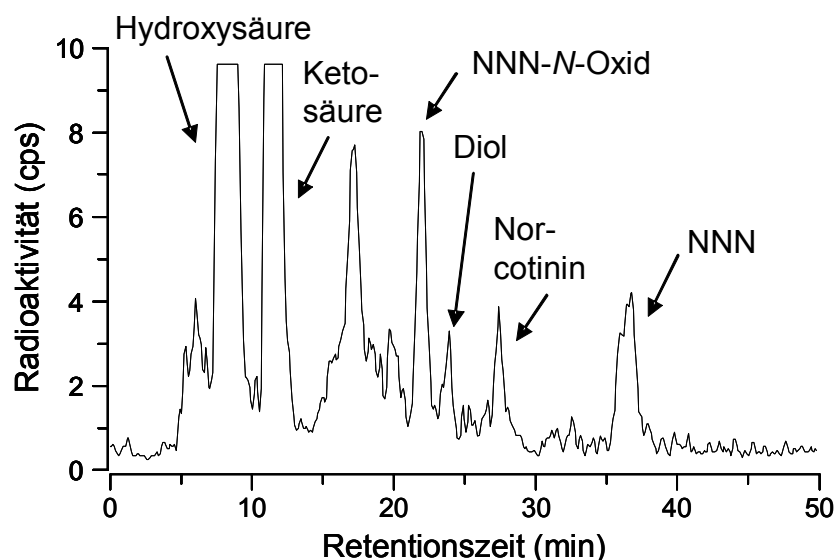


**Abbildung 3-40:** Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von [5-<sup>3</sup>H]-NNN und Myosmin

#### 3.5.4.5 *N*'-Nitrosoanatabin

Durch Co-Administration von NAT ließen sich keine signifikanten Effekte auf den NNN-Metabolismus erzielen. Die Bildungsrate von Hydroxy- und Ketosäure war mit  $46,0 \pm 0,2\%$

und  $32,6 \pm 0,9\%$  (jeweils 103% der Kontrollen) nur leicht erhöht. Dies gilt auch für Diol und Norcotin, die jeweils mit  $1,3 \pm 0,2\%$  (130% der Kontrollen) an der Gesamtradioaktivität beteiligt waren. NNN-*N*-Oxid und NNN waren im Vergleich zu den Kontrollen nur zu 89% ( $3,4 \pm 0,1\%$ ) bzw 81% ( $2,6 \pm 0,3\%$ ) vertreten (Abbildung 3-41, Tabelle 3-12).



**Abbildung 3-41:** Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von [ $5\text{-}^3\text{H}$ ]-NNN und *N'*-Nitrosoanatabin

#### 3.5.4.6 *N'*-Nitrosoanabasin

NAB zeigte die gleichen Wirkungen auf den NNN-Stoffwechsel wie zuvor NAT. Die Anteile der beiden Hauptmetaboliten Hydroxy- und Ketosäure blieben mit  $45,8 \pm 0,3\%$  (102% der Kontrollen) und  $32,2 \pm 0,9\%$  (102% der Kontrollen) nahezu unverändert. Einer geringeren Bildungstendenz für NNN-*N*-Oxid ( $3,5 \pm 0,4\%$ , 92% der Kontrollen) stehen mehr Norcotin ( $1,2 \pm 0,1$ , 120% der Kontrollen) und ein signifikanter Anstieg des Diols ( $1,5 \pm 0,1\%$ , 150% der Kontrollen,  $P < 0,05$ ) gegenüber. Unverstoffwechseltes NNN trug mit  $3,0 \pm 0,3\%$  (94% der Kontrollen) zur Gesamtradioaktivität bei (Tabelle 3-12).

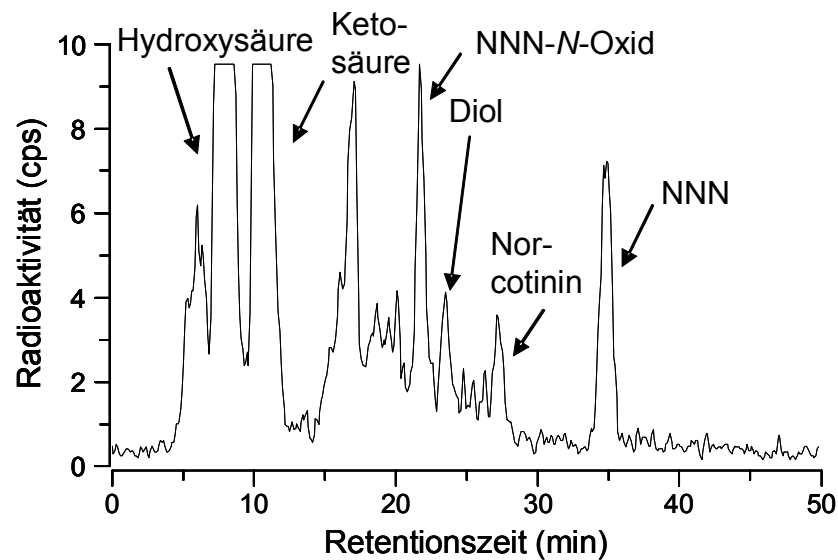


Abbildung 3-42: Exemplarisches Radiochromatogramm eines Urin-Aliquots von F344-Ratten nach gleichzeitiger Gabe von [5-<sup>3</sup>H]-NNN und N'-Nitrosoanabasin

Tabelle 3-12: Einfluss von Nornikotin, Anatabin, Anabasin, Myosmin, N'-Nitrosoanatabin, N'-Nitrosoanabasin auf die Ausscheidung von NNN-Metaboliten in 24 h Urin (MW  $\pm$  SD; n = 4)

Metabolit	Prozent der Radioaktivität in 12 h Urin (Prozent der Kontrolle)						
	Kontrolle	NRN	AT	AB	MYO	NAT	NAB
Hydroxys.	44,8 $\pm$ 2,3	48,2 $\pm$ 1,0 (108)*	44,4 $\pm$ 1,6 (99)	44,7 $\pm$ 1,5 (100)	46,2 $\pm$ 0,8 (103)	46,0 $\pm$ 0,2 (103)	45,8 $\pm$ 0,3 (102)
Ketos.	31,5 $\pm$ 2,0	27,3 $\pm$ 0,5 (87)*	30,9 $\pm$ 1,2 (98)	31,9 $\pm$ 1,1 (101)	31,4 $\pm$ 0,4 (100)	32,6 $\pm$ 0,9 (103)	32,2 $\pm$ 0,9 (102)
N-Oxid	3,8 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 0,4 (118)*	4,0 $\pm$ 0,2 (105)	3,8 $\pm$ 0,3 (100)	3,6 $\pm$ 0,2 (95)	3,4 $\pm$ 0,1 (89)	3,5 $\pm$ 0,4 (92)
Diol	1,0 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,1 (170)**	1,4 $\pm$ 0,1 (140)*	1,4 $\pm$ 0,2 (140)	1,3 $\pm$ 0,1 (130)	1,3 $\pm$ 0,2 (130)	1,5 $\pm$ 0,1 (150)*
Norcotinin	1,0 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,3 (170)	1,6 $\pm$ 0,1 (160)	1,4 $\pm$ 0,2 (140)	1,3 $\pm$ 0,1 (130)	1,3 $\pm$ 0,2 (130)	1,2 $\pm$ 0,1 (120)
NNN	3,2 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,2 (134)**	3,9 $\pm$ 0,7 (122)	3,4 $\pm$ 0,6 (106)	2,9 $\pm$ 0,2 (90)	2,6 $\pm$ 0,3 (81)	3,0 $\pm$ 0,3 (94)

Signifikant verschieden von den Kontrollen: P<0,05 (\*); P<0,01 (\*\*)

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Synthesen

Die meisten Synthesen wurden zur Darstellung von Referenzsubstanzen durchgeführt. Um die Produkte zu charakterisieren wurde auf HPLC oder GC/MS-Methoden zurückgegriffen. In seltenen Fällen kamen NMR- oder LC/MS-Messungen zum Einsatz. Der Nachweis wurde rein qualitativ geführt, so dass es lediglich auf die Reinheit und die korrekten spektroskopischen Eigenschaften der Referenzsubstanzen ankam. Parameter wie Ausbeute oder Schmelzpunkte wurden in den meisten Fällen nicht bestimmt.

Lediglich zwei Synthesen wurden unter anderen Gesichtspunkten durchgeführt:

Bei der Darstellung von HPB konnte das Hauptnebenprodukt identifiziert und die Synthese hinsichtlich der Ausbeute optimiert werden. Die Vorschrift eignet sich in gleicher Weise für die Darstellung von HPB wie auch für Cyclopropyl-pyridin-3-yl-methanon. Indem man bei Zugabe von Butyrolakton durch effektives Rühren des Reaktionsansatzes ein Verklumpen verhindert und die spätere pH-Einstellung unter ständiger Eiskühlung durchführt ist eine deutliche Verschiebung der Anteile des Produktgemisches hin zu mehr HPB zu beobachten.

Für die Synthese von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Myosmin musste eine neue Vorschrift auch unter Berücksichtigung der Durchführbarkeit im Mikromaßstab entwickelt werden. Die Auswahl geeigneter Edukte bereitete dabei erhebliche Schwierigkeiten, da es nur eine geringe Auswahl an  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen gibt, die sich für diese Art Synthese eignen. Zusätzlich gibt es für die Position der Markierung im Molekül – unabhängig von rein chemischen Einschränkungen – durch die angestrebte Verwendung in Metabolismusstudien klare Vorgaben. Anders als bei Tritium-markierten Verbindungen spielt ein Austausch von  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  keine Rolle. Jedoch sollte im vorliegenden Fall die Markierung im Metabolismusverlauf das Ursprungsmolekül nicht als Fragment, wie etwa kurzkettige Alkohole oder Aldehyde, welche im Organismus weiter zu  $^{14}\text{CO}_2$  abgebaut werden, verlassen. Für die Tabakalkaloide ist der Pyridinring für diese Überlegungen das entscheidende Strukturmerkmal. Die Markierung sollte so mit dem Pyridinring assoziiert sein, dass eine Abspaltung im Metabolismus äußerst unwahrscheinlich ist. Daher war die Verwendung von Nikotinsäure angezeigt, wobei die Markierung am Carboxyl-C-Atom lokalisiert war. Da die Abspaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung am Pyridinring in bisherigen Untersuchungen mit Nikotinoiden in Warmblütern bisher nicht beobachtet wurde, könnte der Stoffwechsel der ursprünglich verabreichten Substanz über die  $^{14}\text{C}$ -Markierung mitsamt aller potenziellen Metaboliten theoretisch bis hin zur stabilen Nikotinsäure verfolgt werden (Hecht, 1998; Gorrod, 1999).

Dies ist von großem Vorteil bei der Ganzkörper-Autoradiographie, weil dort die Quantifizierung der Radioaktivitätsmengen ohne Berücksichtigung der metabolischen Umwandlung der applizierten Stoffe erfolgt. Bestimmt wird lediglich die Radioaktivitätsverteilung im Organismus. Würden im Rahmen des Metabolismus aliphatische Aldehyde oder Alkohole abgespalten, die in den Intermediärstoffwechsel z.B. den Citronensäure-Zyklus eingehen, so würde die erhaltene Verteilung nicht mehr derjenigen des relevanten Pyridinrings entsprechen. Außerdem käme es zur Abatmung von  $^{14}\text{CO}_2$ . Für die Myosmin-Synthese ausgehend von Nikotinsäure gab es nur eine nicht für den Mikromaßstab geeignete Vorschrift, die unter anderem die fraktionierte Destillation eines Zwischenprodukts vorsah (Hu et al., 1974). Um dagegen die gängige Synthesevorschrift von *Brandänge und Lindblom* (1976) verwenden zu können, musste Nikotinsäure zum Ethylester umgesetzt werden. Dies sollte quantitativ und ohne Aufreinigung des Esters geschehen. Einen eleganten Weg eröffnete die Veresterung mit 1,1,1-Triethoxyethan in Toluol (Trujillo und Gopalan, 1993). Durch die Verwendung von Toluol war kein Wechsel des Lösungsmittels vor der Weiterreaktion des Esters nötig. Die Synthese konnte somit als „One-pot-reaction“ durchgeführt werden. Die Vorschrift zur Veresterung sah einen dreifachen Überschuss 1,1,1-Triethoxyethan und eine Reaktionsdauer von 24 h vor. Dieses Vorgehen führte jedoch zu keinem quantitativen Umsatz und förderte Nebenprodukte zu Tage. Erst ein Verhältnis von 2:1 und die Verkürzung auf 16 h brachte das gewünschte Ergebnis. Die weiteren Syntheseschritte konnten problemlos auf den Mikromaßstab adaptiert werden. Lediglich die abschließende Destillation wurde durch eine Aufreinigung an Kieselgel ersetzt. So konnte bei Vorabversuchen mit unmarkierter Nikotinsäure, der nur Spuren der  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindung beigemischt wurden, identische Ausbeuten wie bei der Myosminsynthese nach *Brandänge und Lindblom* (1976) erzielt werden. Dies bestätigte auch die quantitative Veresterung. Probleme bereitete schließlich die verwendete  $^{14}\text{C}$ -Nikotinsäure, deren radiochemische Reinheit nur 97,6% betrug und die außerdem stark durch nicht-markierte Substanzen verunreinigt war. Die spätere Synthese von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Myosmin resultierte daher nur in einer Ausbeute von ca. 15% mit einer radiochemischen Reinheit von 96,8%. Da die erhaltene Menge für die Durchführung des Autoradiographie-Projekts ausreichte, wurde auf eine erneute Durchführung nach vorheriger Aufreinigung der  $^{14}\text{C}$ -Nikotinsäure verzichtet.

## 4.2 Myosmin in Nahrungsmitteln

Nachdem Myosmin in Nüssen und Nussprodukten (Zwickenpflug et al., 1998) nachgewiesen werden konnte, sollte ursprünglich Schokolade analysiert werden. Aufgrund der komplexen Verarbeitung und Zusammensetzung wurde dieses Vorhaben zugunsten vermeintlich einfacherer Matrices aufgegeben. Dabei wurde ein breites Spektrum an Produkten untersucht, welches sowohl Grundnahrungsmittel, als auch Obst, Gemüse und Genussmittel umfasste. Jedoch sollte keine Marktübersicht bestimmter Produkte gegeben werden, sondern vielmehr anhand einzelner Stichproben die weitläufige Verbreitung von Myosmin gezeigt werden. Die Analyseplanung orientierte sich an realen Verzehrbedingungen. So wurde die Schale bestimmter Obst und Gemüsesorten getrennt untersucht. Obwohl die meisten der getesteten Grundnahrungsmittel, wie Weizen, Reis, Mais, Hirse oder Kartoffeln in gekochtem Zustand verzehrt werden, geschieht der Kochvorgang nur bei Reis und Kartoffeln in Wasser, welches anschließend nicht mitgegessen wird. Das heißt, bei diesen Speisen bestünde die Gefahr, dass sich der Myosmin-Gehalt durch das Kochen und Verwerfen des Wassers verändert. Daher wurden Reis und Kartoffeln vor der Analyse entsprechend in Leitungswasser gekocht. Auch kann eine temperaturbedingte Veränderung des Myosmins unter Kochbedingungen ausgeschlossen werden, da die Verbindung unter diesen Umständen gegenüber Erhitzen stabil ist. Das entwickelte Aufreinigungs- und Analysenverfahren konnte auf alle Matrices angewendet werden und basiert auf dem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen offenkettiger Aminoketon- und geschlossener Imin-Form. Obwohl keine Kenntnisse über die Bindungsverhältnisse von Myosmin in biologischen Matrices vorliegen, konnte Myosmin in saurem Milieu aus den Nahrungsmittel-Proben extrahiert werden. Bei der Analyse von Proben mit hohem Stärke- bzw. Pektinanteil gestalteten sich die nachfolgenden Zentrifugations- und Filtrationsschritte schwieriger als bei den anderen Proben. Die saure Hydrolyse von Stärke führt zu einem klebrigen Gemisch an Polysacchariden wogegen Pektin in Gegenwart von Säure und Fruktose gelatineähnlich wird. Unter diesen Bedingungen setzten sich Filter und SPE-Säulchen extrem schnell zu. Dem konnte durch weitere Verdünnung des Probenextrakts und zwischenzeitliche Waschschrte der Filter entgegengewirkt werden. Vor der Anreicherung am C18-Material der SPE-Säulchen wurde der pH der Lösung auf 7 eingestellt um Myosmin in die Imin-Form zu bringen und so Wechselwirkungen mit dem Packungsmaterial zu ermöglichen. Das Eluat konnte schließlich ohne weitere Aufreinigung mit GC/MS analysiert werden. Dies war erst nach Wechsel des Elutionslösungsmittelgemisches möglich. Bei den Nussproben wurde noch eine Mischung aus  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3/2 verwendet, was jedoch eine unnötige Verunreinigung des Eluats mit sich brachte. Durch

Verwendung von reinem  $\text{CHCl}_3$  konnte das Maß der Verunreinigung durch unerwünschte Matrixbestandteile erheblich reduziert werden.

Der Nachweis von Myosmin in Milch und Milchprodukten gibt Rätsel auf. Bezieht man die Ergebnisse des Stoffwechselversuchs an Wistar-Ratten mit ein, so wäre ein schneller und vollständiger Metabolismus von Myosmin zu erwarten. Dies widerspräche einer Anreicherung unveränderten Myosmins in der Milch. Andererseits konnte Myosmin in neueren Untersuchungen in der gleichen Größenordnung wie in Nahrungsmitteln auch in Muttermilchproben nachgewiesen werden (Maier, persönliche Mitteilung). Wahrscheinlich gelangt Myosmin durch die pH-abhängige Ring-Ketten-Tautomerie in unterschiedlichste Gewebe und wird in der Folge aufgrund deren unterschiedlicher Stoffwechselaktivität selektiv angereichert. Dies könnte bevorzugt in Bereichen mit hohem Fettanteil geschehen.

Die Biosynthese von Myosmin in den positiv getesteten Pflanzen konnte bislang nicht geklärt werden. Mögliche Vorstufen wären Nikotin und Nornikotin (Bush et al., 1993), die jedoch beide mit der vorliegenden Methode nicht nachgewiesen werden konnten. Für Myosmin zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster auf die Vertreter verschiedener Pflanzenfamilien wie dies bei Nikotin beobachtet werden konnte. War ein Vertreter positiv getestet worden, so konnte auch in weiteren Myosmin nachgewiesen werden. Nikotin ist nicht nur in *Nicotiana spp* enthalten, sondern auch in *Duboisia hopwoodi*, *Equisetum*, *Lycopersicum*, *Lycopodium*, *Sedum* und *Solanum* Spezies gefunden worden (Luanratana und Griffin, 1982; Davis et al., 1991; Castro und Monji, 1986; Sheen, 1988). Studien von *Siegmund et al.* (1999) zu Nikotin in essbaren Nachtschattengewächsen zeigten ebenfalls dessen Vorkommen in einer Vielzahl von Vertretern einer Pflanzenfamilie. Nach heutigem Kenntnisstand ist demnach das Myosmin-Vorkommen in den verschiedenen Pflanzenfamilien nicht mit dem Auftreten anderer Nikotinoide verbunden.

Oft und kontrovers diskutiert wird die Belastung mit Tabakbestandteilen durch Passivrauchexposition. Im Falle des Nikotins wurde ein signifikanter Beitrag der Nahrung zur Gesamtbelastung von Nichtrauchern gegenüber der Belastung mit Nikotin durch ETS ausgeschlossen (Benowitz, 1996; Domino et al., 1993a; Domino et al., 1993b). Diese Untersuchungen beruhten auf der Messung von Cotinin in Urin. Cotinin stellt jedoch keinen Marker für die Myosmin-Aufnahme dar. Folglich ist die Schlussfolgerung für Myosmin nicht zu halten. Andere gängige Methoden zur Unterscheidung von Rauchern (R), Nichtrauchern (NR) und Passivrauchern (PR) basieren auf der Messung von Kohlenmonoxid im Exhalat (NR: 2-6 ppm; R: 20-40 ppm) oder dem Cotiningehalt im Plasma (NR: 0-0,2 ng/ml; PR: 0,2-5

ng/ml; R: 100-300 ng/ml) (Richter und Scherer, 2004). Daneben wurde versucht, die Menge an HPB nach Abspaltung von DNA oder Hämoglobin mit dem Rauchstatus zu korrelieren (Scherer und Richter, 1997). Die Messergebnisse zeigen jedoch nicht die erwarteten Differenzen in den Adduktlevels. Es scheint eine gleichmäßige Belastung aller Gruppen mit Substanzen zu geben, die unabhängig vom Rauchstatus zu diesen Addukten führen (Falter et al., 1994; Branner et al., 1998). Myosmin könnte aufgrund seines weitläufigen Vorkommens und der leichten Nitrosierbarkeit eine Quelle für diese Addukte darstellen. Bislang gibt es noch keinen Biomarker für die Myosmin-Aufnahme. Das im Zuge des Myosmin-Metabolismus bei Ratten entdeckte 3'-Hydroxymyosmin könnte einen potenziellen Biomarker darstellen. Dies setzt voraus, dass im menschlichen Urin ebenfalls 3'-Hydroxymyosmin als Myosminmetabolit erscheint. Solange weitere Untersuchungen noch ausstehen, kann eine Myosmin-Belastung des Menschen durch ETS nur abgeschätzt werden. Die Konzentration von Myosmin in der Luft liegt über den Zeitraum von 24 h durchschnittlich zwischen 0,004 und 0,185  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Jenkins et al., 1996). Für einen Nichtraucher mit geringer bzw. starker ETS-Belastung kann daher eine Myosmin-Aufnahme von 3,65 – 803,00  $\mu\text{g}/\text{Jahr}$  errechnet werden. Als Grundlage dienen entsprechende pharmakokinetische Daten für das Nikotin, aus denen obige Werte für Myosmin abgeschätzt werden können (Benowitz, 1996). Auf der Grundlage des Pro-Kopf-Konsums der positiv getesteten Lebensmittel ergibt sich eine durchschnittliche jährliche Myosmin-Aufnahme von 497,49  $\mu\text{g}$  (Tabelle 4-1). Die Schätzung bezieht bislang nicht entdeckte Quellen und unterschiedliche Essgewohnheiten natürlich nicht mit ein. Aufgrund der Vielzahl an positiv getesteten Grundnahrungsmitteln sollten sich die Werte der Myosmin-Exposition durch Nahrungsaufnahme weltweit jedoch nicht dramatisch unterscheiden.

Die Veränderungen bei den Inzidenzraten für Adenokarzinome (AC) bzw. Plattenepithelkarzinome (SCC) des Ösophagus bei bestimmten Bevölkerungsgruppen werden in epidemiologischen Studien mit Veränderungen des BMI und den allgemeinen Essgewohnheiten korreliert. Im Gegensatz zum SCC besteht für AC nur ein geringer Zusammenhang mit dem Tabak- oder Alkoholkonsum, der auch den starken Anstieg der Inzidenz von AC nicht erklären kann. Dagegen wird der erhöhte BMI bestimmter Bevölkerungsanteile und die damit verbundenen oft einseitigen Ernährungsgewohnheiten mit dem Auftreten von AC in Verbindung gebracht. Epidemiologische Studien in Nebraska ergaben ein erhöhtes Risiko an AC des Ösophagus zu erkranken bei vermehrtem Verzehr von Fleisch, gesalzenen Snacks, Milch und Weißbrot (Chen et al., 2002). Für Venezuela zeigte eine Fall-Kontroll-Studie ein erhöhtes Risiko für Ösophagus-AC bei übermäßigem Verzehr von Getreide, stärkehaltigem



Gemüse, Milchprodukten und Früchten (Muñoz et al., 2001). Vermehrter Konsum von Brot, Nudeln und Reis wurde ebenfalls mit der steigenden Inzidenz von AC des Ösophagus in Italien korreliert (Chatenoud et al., 1999). Andererseits soll die Ernährung mit einem hohen Anteil an Früchten und Gemüse das Risiko für diese Tumorart um bis zu 50% senken (Chen et al., 2002; Terry et al., 2001). Ebenso wird dieser Effekt der Aufnahme von Vitamin A, Vitamin C und Rohfasern zugesprochen (Tzonou et al., 1996).

**Tabelle 4-1: Abschätzung der Myosmin-Exposition durch Nahrungsaufnahme. Werte zum Pro-Kopf-Verbrauch beziehen sich auf Deutschland.**

	Pro-Kopf-Verbrauch	Myosmingehalt min/max	Myosmin-Exposition		Myosmin-Exposition (Durchschnitt)
			min	max	
	kg/Jahr	ng/g	µg/Jahr	µg/Jahr	µg/Jahr
Reis	3,5	0,19 – 1,15	0,67	4,03	2,35
Mais	4,5	0,48 – 1,6	2,16	7,20	4,68
Weizenmehl	58,9	0,37 – 0,51	21,79	30,04	25,92
Hirse	0,4	0,41 – 0,43	0,16	0,17	0,17
Kartoffeln	70	2,41 – 4,47	168,70	312,90	240,80
Tomaten	17,5	0,53 – 0,66	9,28	11,55	10,41
Kakao	2,9	0,68 – 0,85	1,97	2,47	2,22
Milch	91,2	1,16 – 1,35	105,79	123,12	114,46
Sahne	7,9	5,93 – 6,26	46,85	49,45	48,15
Karotten	5,9	0,01 – 0,03	0,06	0,18	0,12
Apfel	40	1,12 – 1,25	44,80	50,00	47,40
Ananas	1,2	0,66 – 0,72	0,79	0,86	0,83
<b>Summe</b>			<b>403,02</b>	<b>591,97</b>	<b>497,49</b>

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen daher obige Studien. In diversen Nahrungsmitteln, deren vermehrte Aufnahme mit einer erhöhten Inzidenz von Ösophagus-AC korreliert wird, wurde Myosmin nachgewiesen. Aufgrund der leichten Nitrosierbarkeit ohne Beteiligung enzymatischer Prozesse ist eine Reaktion mit Nitrit aus der Nahrung bzw. aus Speichel oder dem Magen denkbar. Die Reaktion führt über eine instabile Zwischenstufe, wobei eine kovalente Bindung an DNA nachgewiesen werden konnte (Wilp et al., 2002). Damit in Zusammenhang stehen epidemiologische Untersuchungen, die AC des Ösophagus mit dem

Auftreten der Refluxkrankheit korrelieren. Der regelmäßige Reflux von Mageninhalt in den Ösophagus führt nicht nur zu einem erniedrigten pH in diesem Bereich, sondern bewirkt über Entzündungsvorgänge eine dauerhafte Veränderung des Gewebes (Barrett-Ösophagus). Auslöser der Refluxkrankheit können psychosozialer Stress oder veränderte Essgewohnheiten sein (DeMeester et al., 1999). Das Zusammentreffen eines niedrigen pH in Beisein von Nitrit an entzündetem Gewebe mit Myosmin aus der Nahrung könnte das gehäufte Auftreten von AC des Ösophagus bei bestimmten Risikogruppen erklären. So wurde ein 40fach höheres Risiko für Personen mit langandauernder Refluxerkrankung und schweren Symptomen festgestellt (Terry et al., 2000). Und obwohl der Zusammenhang zwischen Refluxerkrankung, Barrett-Ösophagus und schließlich AC anerkannt ist, so zeigen die vergleichsweise niedrigen Inzidenzraten bei Patienten mit Barrett-Ösophagus, dass andere Faktoren, wie zum Beispiel die Nahrung einen wichtigen Beitrag zur Kanzerogenese dieses Tumortyps leisten (Spechler et al., 2001).

#### **4.3 Dosisabhängiger Myosmin-Metabolismus bei Wistar-Ratten**

Da Myosmin lange Zeit als tabakspezifisches Alkaloid mit geringer toxikologischer Relevanz betrachtet wurde, gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich speziell mit dieser Verbindung beschäftigen. Meistens trat Myosmin als Metabolit bei Stoffwechselstudien anderer Substanzen auf. So wurde nach Inkubation von Ratten-Lebermikrosomen mit NNK Myosmin gefunden, bei *in vivo* Versuchen konnte jedoch kein Myosmin in Rattenurin nachgewiesen werden (Hecht et al., 1980c). Studien zum Metabolismus von NNN an Ratten zeigten Spuren von Myosmin im Urin. Um die weitere Verstoffwechslung der NNN-Metaboliten zu untersuchen wurde Myosmin in einer Dosis von 100 mg/kg KG subcutan an Ratten verabreicht. Durch Retentionszeitvergleich nach UV-Detektion wurde Ketosäure als Metabolit von Myosmin zugeordnet (Hecht et al., 1981b). Die verwendete Dosierung entsprach jedoch in keinsten Weise realen Expositionsbedingungen. Daher wurden für die Versuchsplanung zum dosisabhängigen Metabolismus von Myosmin bei Ratten die bisherigen Ergebnisse miteinbezogen. Die verwendeten Dosierungen orientierten sich an den in ETS oder Nahrungsmitteln enthaltenen Myosminmengen. Ebenso wurde die perorale Applikation aufgrund des Vorkommens in Nahrungsmitteln und dem potenziellen Zusammenhang mit der steigenden Inzidenz von Ösophagus-AC gewählt. Durch das Füttern eines präparierten Apfelstücks wird nicht nur unnötiger Stress der Tiere vermieden, sondern auch der Kontakt von Myosmin mit Mundhöhle und Ösophagus sichergestellt.

Es konnte über den gesamten Dosisbereich eine schnelle und vollständige Verstoffwechslung von Myosmin beobachtet werden. Die bezüglich ihres Metabolitenspektrums untersuchten Urinproben enthielten bereits nach 6 h kein unverstoffwechseltes Myosmin. Dies bestätigt frühere Studien, bei denen nach peroraler Applikation von 2 mg Myosmin an Menschen kein Myosmin im Urin nachweisbar war (Beckett et al., 1971).

Die identifizierten Metaboliten 3-Pyridylessigsäure (3-PAA), Ketosäure und HPB sind aus anderen Metabolismusstudien bereits bekannt, jedoch stellt das gleichzeitige Auftreten nach Gabe eines einzigen Stoffes ein Novum dar. Über den *in vivo* Bildungsweg dieser Metaboliten aus Myosmin kann nur spekuliert werden.

3-PAA wurde in Urin von Menschen und Ratten nach Gabe von Nikotin, Cotinin und Ketosäure nachgewiesen (McKennis et al., 1964a; McKennis et al., 1964b; Schepers et al., 1993). Beim Phase 1 Metabolismus von Nikotin stellt 3-PAA eines der Endprodukte dar. Die Bildung von 3-PAA aus Ketosäure kann bis heute nicht befriedigend erklärt werden. Auch Studien an Ratten, Kaninchen und Hunden, denen Ketosäure verabreicht wurde, konnten keinen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung des Metabolismuswegs liefern. Es wurden zwar Hydroxysäure, 4-(3-Pyridyl)butansäure und 3-PAA als Metaboliten nachgewiesen, diese treten jedoch nicht in allen untersuchten Spezies gleichzeitig auf (McKennis et al., 1964b). Gemeinhin wird die Bildung von 3-PAA aus Ketosäure wie folgt erklärt: Die Ketosäure wird zunächst zu Hydroxysäure reduziert und anschließend zu 4-(3-Pyridyl)-3-butensäure dehydratisiert. Die Doppelbindung wird schließlich zu 4-(3-Pyridyl)butansäure hydriert. Diese Verbindung ist der  $\beta$ -Oxidation via Knoop-Abbau zugänglich (McKennis et al., 1964a; Meacham et al., 1972). Nach Abspaltung einer C2-Einheit kann die entstehende 3-PAA nicht weiter abgebaut werden. Dieser Reaktionsweg ist jedoch auf den Myosmin-Metabolismus nicht übertragbar, da weder Hydroxysäure noch eine der anderen Zwischenstufen nachgewiesen werden konnten. Deshalb und aufgrund des hohen prozentualen Anteils der 3-PAA am Gesamtstoffwechsel wird über einen direkteren Bildungsweg im Zuge eines first pass-Metabolismus spekuliert. So bietet Myosmin aufgrund seines reversiblen und pH-abhängigen Hydrolysegleichgewichts in der offenkettigen Aminoketonform zwei leicht angreifbare Gruppen (Abbildung 4-1).

Ketosäure ist bei Nagern und Primaten einer der Hauptmetaboliten nach Gabe von NNN und NNK. Der Reaktionsweg verläuft für beide TSNA über eine  $\alpha$ -Hydroxylierung, die zu HPB führt, welches zu Ketosäure weiteroxidiert wird (Hecht, 1998). In beiden Fällen wurde keine 3-PAA nachgewiesen, obwohl die postulierte Vorstufe Ketosäure einen der Hauptmetaboliten

darstellt. Eine Erklärung könnte die Bildung der Ketosäure in unterschiedlichen Geweben mit unterschiedlicher Stoffwechselaktivität sein. Die Bildung von Ketosäure aus NNN und NNK ist erst nach metabolischer Aktivierung durch Cytochrom P450 Isoenzyme möglich. Daher sollte ein Großteil des Stoffwechsels in der Leber stattfinden. Myosmin stellt dagegen ein viel reaktiveres Molekül dar und bietet diverse Angriffspunkte ohne enzymatische Beteiligung. Es könnten daher bereits früh und in anderen Geweben Spezies vorliegen, die durch  $\beta$ -Oxidation weiter abgebaut werden können.

Die Bildung von HPB und Ketosäure könnte auch mit einer Aktivierung des Myosmins durch Nitrosierung erklärt werden. *In vitro* Studien von Wilp *et al.* (2002) zeigten ein pH-abhängiges Produktgemisch von HPB und NNN nach Nitrosierung von Myosmin. Das identifizierte Metabolitenmuster der vorliegenden *in vivo* Studie lässt nun folgende Schlüsse zu: Da weder NNN noch sein Hauptmetabolit, die Hydroxysäure, nachweisbar waren, sind entweder die *in vitro* Ergebnisse der Nitrosierung nicht auf *in vivo* Verhältnisse übertragbar oder die Verstoffwechslung von Myosmin findet *in vivo* überwiegend nicht auf dem Weg der Nitrosierung statt.

Auf der Suche nach spezifischen Biomarkern für die TSNA-Belastung applizierte man [ $5\text{-}^3\text{H}$ ]-Ketosäure i.v. an Ratten um festzustellen, ob Ketosäure eine mögliche Quelle für Hydroxysäure darstellt. Es wurden nur 1,1% der verabreichten Dosis als Hydroxysäure ausgeschieden, wogegen 94,8% in unveränderter Form als Ketosäure im Urin erschienen (Trushin und Hecht, 1999). Für den Fall, dass Ketosäure die einzige Quelle für Hydroxysäure darstellt und der Umsatz nach Metabolismus und/oder Nitrosierung des Myosmins über HPB zur Ketosäure im gleichen Umfang erfolgt wie nach i.v. Gabe, läge die zu erwartende Menge an Hydroxysäure nach Myosmingabe im vorliegenden Versuch bei circa 0,5% aller Metaboliten und damit unterhalb der Nachweisgrenze.

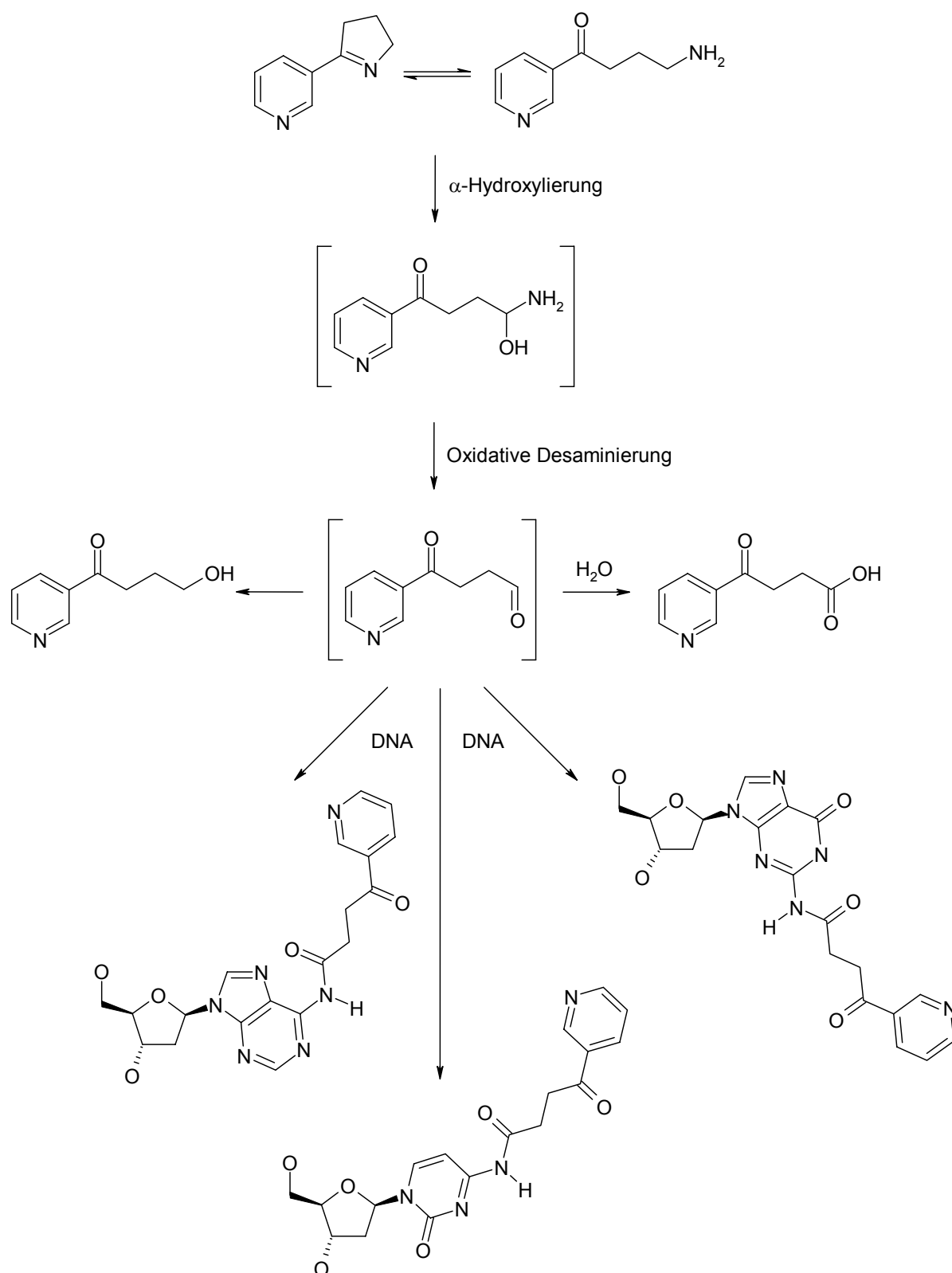
Den vielversprechendsten Myosmin-Metaboliten stellt das 3'-Hydroxymyosmin dar. Diese Verbindung entsteht nach  $\beta$ -Hydroxylierung und birgt das Potenzial eines künftigen Biomarkers für die Myosmin-Exposition, da 3'-Hydroxymyosmin nach bisherigem Kenntnisstand nur aus Myosmin gebildet wird. Die geringen Mengen dieser hydroxylierten Spezies im Rattenurin sind nicht ungewöhnlich, da auch im Falle des NNN die Metaboliten 3'- und 4'-Hydroxy-NNN bei Nagern nur in Spuren im Urin nachweisbar waren (Hecht *et al.*, 1980b; Hoffmann *et al.*, 1981). Dagegen lag der Anteil von 3'-Hydroxynorcotinin an den Gesamtmetaboliten im Urin von Patas-Affen nach NNN-Gabe bei 16,9% (Upadhyaya *et al.*,

2002). Für Myosmin stehen bislang keine Ergebnisse aus Stoffwechseluntersuchungen an Primaten zur Verfügung.

Das Auftreten der Ketosäure war bis zur vorliegenden Arbeit ausschließlich mit dem Konsum von Tabakprodukten assoziiert. Dies führte zu dem Glauben einen weiteren Biomarker für die Exposition mit Tabakalkaloiden oder TSNA in Händen zu halten (Hecht et al., 1999). Durch den Nachweis von Ketosäure als Hauptmetabolit von Myosmin und das weitläufige Vorkommen in Nahrungsmitteln stellt Myosmin eindeutig eine weitere Quelle für Ketosäure dar, die unabhängig von jeglicher aktiver oder passiver Belastung mit Tabakprodukten bzw. Tabakrauch ist.

Eine der wichtigsten Fragen bei Metabolismus-Studien, ist die nach einer möglichen Giftung der verabreichten Substanz und einem damit verbundenen Schaden für den Organismus. Dies kann unter anderem durch die Bildung einer akut toxischen Verbindung geschehen. Nicht minder gefährlich sind Verbindungen, die instabile und damit reaktive Zwischenstufen bilden. Diese Intermediate sind oft in der Lage kovalent an DNA oder Proteine zu binden. Nach *in vitro* Nitrosierung von Myosmin konnte eine kovalente Bindung an Kalbsthymus-DNA nachgewiesen werden (Wilp et al., 2002). Über den genauen Mechanismus und die Struktur der Addukte kann nur spekuliert werden.

Da aus Studien mit anderen Tabakalkaloiden diverse Aktivierungswege postuliert wurden und aufgrund der Tatsache, dass die identifizierten Myosmin-Metaboliten die Endpunkte einzelner Stoffwechselwege anzeigen, kann ein theoretisch begründetes Aktivierungsschema erstellt werden (Abbildung 4-1). Es muss jedoch betont werden, dass weder für die dargestellten instabilen Zwischenstufen, noch für die resultierenden Addukte Beweise vorliegen. Die vorgeschlagenen Addukte gehen nicht auf eine aktivierte HPB-Spezies zurück. Folglich könnten die Adduktmengen auch nicht auf klassischem Weg nach Spaltung durch die Bestimmung des freiwerdenden HPB quantifiziert werden. Dies schließt jedoch einen wie für die Myosmin-Nitrosierung vorgeschlagenen Aktivierungsweg keineswegs aus (vgl. Kapitel 1.7.4), welcher zu DNA-Addukten führt, die nach saurer Hydrolyse HPB abspalten. Obwohl das HPB vermessen werden kann (Schlöbe, 2003), fehlt bislang die strukturelle Aufklärung der Addukte resultierend aus einer Myosmin-Exposition. Eine weitere Quelle für DNA-Addukte könnten Zwischenstufen des bislang nicht aufgeklärten Metabolismusweges zur 3-PAA darstellen.



**Abbildung 4-1:** Möglicher Abbauweg von Myosmin hin zu HPB und Ketosäure. Aufgrund der Bildung einer instabilen Zwischenstufe sind kovalente Bindungen an DNA-Basen denkbar.

#### 4.4 Einfluss von Tabakalkaloiden, TSNA und PEITC auf den NNN-Stoffwechsel bei F344-Ratten

Im Gegensatz zu NNK ist dies die erste *in vivo* Wechselwirkungsstudie, um den Einfluss verschiedener gleichzeitig verabreichter Stoffe auf den NNN-Metabolismus zu erfassen. Dazu wurde [5-<sup>3</sup>H]-NNN an F344-Ratten appliziert. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität war es möglich eine Menge von 30 nmol/kg KG zu verabreichen. Die eingesetzten Dosierungen orientierten sich an den real vorkommenden Verhältnissen. Die Ausnahme bildeten Nikotin und Cotinin. Obwohl ein 5000 facher Überschuß gegenüber NNN angezeigt gewesen wäre (Djordjevic et al., 1989a), war dies aufgrund der akut toxischen Wirkung von Nikotin nicht möglich. Schließlich wurde ein 500 facher Überschuß verwendet, welcher zu keinerlei Auffälligkeiten bei den Tieren führte. Die Cotiningabe orientierte sich nicht an den geringen in Tabakprodukten nachgewiesenen Mengen, die nur etwa um den Faktor 20 über den entsprechenden NNN-Mengen liegen (Pakhale und Maru, 1998). Cotinin ist aber der Hauptmetabolit des Nikotins und liegt wegen seiner langsamen Weiterverstoffwechslung in deutlich höheren Konzentrationen im Plasma vor als Nikotin. Daher erhielten die Ratten einen 5000 fachen Überschuß Cotinin gegenüber NNN. PEITC wurde nicht subcutan verabreicht, sondern dem Futter in einer Konzentration von 1 µmol/g beigemischt. Die Fütterung mit PEITC begann bereits einen Tag vor Versuchsbeginn und wurde während des Versuchs fortgesetzt. Die verabreichte Menge entspricht den bei anderen Studien verwendeten Konzentrationen von 1-3 µmol/g Futter (Sticha et al., 2002; Richter und Tricker, 2002).

Da die Stoffwechselwege des NNN bekannt sind (siehe Abbildung 1-17), konnten die erhaltenen Signale der Radiochromatogramme durch Co-Chromatographie leicht den entsprechenden Metaboliten zugeordnet werden. Die Reaktionen zu NNN-N-Oxid und Norcotinin sind Inaktivierungswege, wogegen die nach 2'- und 5'-Hydroxylierung auftretenden Metaboliten über instabile, reaktive Zwischenstufen gebildet werden. Bislang konnte eine kovalente Bindung an DNA bzw. Proteine nur für das infolge 2'-Hydroxylierung auftretende 4-(3-Pyridyl)-4-oxobutan-diazohydroxid nachgewiesen werden. Demzufolge wird der NNN-Metabolismus über 5'-Hydroxylierung auch den Inaktivierungswegen zugeschrieben. Die Verhältnisse der auftretenden Metaboliten geben also Auskunft über den Anteil der verschiedenen Stoffwechselwege am Gesamtmetabolismus. Daraus lässt sich ein vermindertes bzw. erhöhtes Risiko für eine DNA-Bindung unter bestimmten Rahmenbedingungen ermitteln. Die gleichzeitige Gabe anderer Tabakalkaloide, TSNA oder PEITC kann zu einer Verschiebung der prozentualen Metabolitenanteile führen und damit unter Umständen einen chemopräventiven Effekt ausüben. Bei der Ratte stellen Ketosäure

(über 2'-Hydroxylierung) und Hydroxysäure (über 5'-Hydroxylierung) die beiden Hauptmetaboliten dar. Der Ketosäure-Anteil spiegelt dabei indirekt das kanzerogene Potenzial von NNN wieder.

In der ersten Studie wurde NNN gleichzeitig mit Nikotin, Cotinin und PEITC verabreicht. Alle drei Substanzen zeigten bereits in diversen NNK-Studien eine chemopräventive Wirkung durch Verringerung des Metabolitenanteils nach  $\alpha$ -Hydroxylierung (vgl. Kap. 1.6.5). Im Falle des NNN konnte eine verminderte Bildung von Ketosäure bei gleichzeitig vermehrter Hydroxysäurebildung festgestellt werden. Die prozentualen Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren waren für diese Metaboliten signifikant und in der selben Größenordnung wie bereits beim NNK-Metabolismus bei Syrischen Goldhamstern ermittelt (Richter und Tricker, 2002).

Die in der zweiten Studie verwendeten Tabakalkaloide und TSNA wurden bislang noch nicht zu *in vivo* Wechselwirkungsversuchen mit NNN bzw. NNK herangezogen. Nornikotin, Anatabin, Anabasin und Myosmin kommen in Mengen von 0,2-1 mg/g in Tabak vor, wogegen die TSNA *N'*-Nitrosoanatabin und *N'*-Nitrosoanabasin nur in Mengen von 1,6 und 0,1  $\mu$ g/g gefunden wurden (Sisler, 1969; Djordjevic et al., 1989a). Die letztlich verabreichten Dosierungen orientierten sich an den Verhältnissen der Nikotinoide und TSNA im Tabakrauch. Lediglich Nornikotin hatte einen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis von Keto- und Hydroxysäure. Die Veränderung lag in der gleichen Größenordnung wie bei Nikotin, Cotinin und PEITC.

Bezüglich NAT bestätigen die Ergebnisse frühere *in vitro* Untersuchungen an Mundschleimhautzellen. Dabei zeigte NAT auch bei 100fachem Überschuß keinen Einfluss auf den NNN-Stoffwechsel wogegen eine deutliche Hemmung des NNK-Stoffwechsels schon bei niedrigen Dosierungen beobachtet werden konnte (Murphy und Heiblum, 1990).

Ein Tier der NAT-Gruppe, die neben NNN noch *N'*-Nitrosoanatabin erhielt, zeigte eine verzögerte Ausscheidung der Radioaktivität über den Urin. Die Radioaktivitätsmenge im Zeitraum 0-12 h lag deutlich unter der der anderen Tiere, dagegen war die Ausscheidung im Intervall 12-24 h erhöht. Dies könnte daran gelegen haben, dass das Tier bei der subcutanen Applikation bereits stark urinierte. Zusätzlich könnte es zu einer Verweigerung der Wasseraufnahme in den ersten 12 h gekommen sein, was durch die geringe Urinmenge bestätigt würde. Ein weiterer Grund könnte eine versehentliche intrakutane Applikation sein, welche zu einer verzögerten Resorption führen kann. Die insgesamt in den ersten 24 h ausgeschiedene Radioaktivität lag in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen Ratten,



so dass eine fehlerhafte Applikation ausgeschlossen werden konnte. Die ermittelten Werte erfüllen die Kriterien eines Ausreißers. Wird die Ratte bezüglich der Urinausscheidung in den ersten 24 h aus der Berechnung genommen ergeben sich die in Tabelle 4-2 gezeigten Daten:

**Tabelle 4-2: Modifizierte Tabelle 3-10 nach Streichung eines Ausreißers der NAT-Gruppe**

Gruppe	Urin <sup>a</sup>				Faeces <sup>a</sup>	Gesamt <sup>b</sup>
	0-12 h	12-24 h	24-48 h	0-72 h	0-72 h	0-72 h
Kontrolle	81,4 ± 3,8	8,2 ± 2,2	2,1 ± 0,5	93,8 ± 2,4	6,2 ± 2,4	111,8 ± 6,4
NAT	79,5 ± 4,3	10,9 ± 5,5	2,1 ± 0,6	92,9 ± 1,7	7,1 ± 1,7	120,2 ± 6,6

<sup>a</sup> Prozent basierend auf insgesamt ausgeschiedener Radioaktivität

<sup>b</sup> Prozent basierend auf gesamt applizierter Radioaktivität

Bei *in vitro* Studien mit NNAL konnte ein DNA-Addukt identifiziert werden, welches nach Spaltung Diol freisetzt (Upadhyaya et al., 2003). Sollte sich bei weiteren Untersuchungen zum NNN-Metabolismus herausstellen, dass auch der Stoffwechselweg nach 5'-Hydroxylierung *in vivo* zu einer kovalenten DNA-Bindung führt, müsste bezüglich einer Risikoabschätzung anders argumentiert werden. Alle Metaboliten, welche nach 2'- und 5'-Hydroxylierung entstehen, müssten addiert und ein eventueller Einfluss gleichzeitig verabreichter Substanzen darauf bezogen werden. Addiert man Hydroxysäure, Ketosäure und Diol bei denjenigen Gruppen, die gleichzeitig zu NNN noch andere Substanzen erhielten, so ergeben sich nur minimale Veränderungen gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen (Tabelle 4-3). Es handelt sich folglich primär um eine Umverteilung zwischen Hydroxy- und Ketosäure, ohne dass sich der Gesamtanteil der Metaboliten nach  $\alpha$ -Hydroxylierung am Metabolismus ändert.

Die beiden durchgeführten Studien beschränken sich auf die Erfassung des Einflusses einzelner Substanzen auf den NNN-Metabolismus. Am Beispiel des Tabakrauchs lässt sich jedoch erkennen, dass tausende Substanzen miteinander interagieren. Die dabei auftretenden aktivierenden bzw. inaktivierenden Einflüsse sind schwer zu trennen und noch schwerer einzeln zu quantifizieren. Das gewählte Versuchsdesign kann daher kein umfassendes Bild der metabolischen Vorgänge nach Aufnahme von NNN in Verbindung mit Tabakkonsum liefern, sondern stellt lediglich ein weiteres Puzzleteil in der komplexen Kanzerogenese von Tabakinhaltsstoffen dar.

**Tabelle 4-3: Summe der identifizierten Metaboliten, welche nach 2'- und 5'-Hydroxylierung von NNN entstehen (MW  $\pm$  SD; % der Kontrolle)**

Versuchstiergruppe	$\Sigma$ 2'-Hydroxylierung (Ketosäure)	$\Sigma$ 5'-Hydroxylierung (Hydroxysäure, Diol)	$\Sigma$ $\alpha$ -Hydroxylierung
Kontrolle	32,4 $\pm$ 1,6	45,5 $\pm$ 2,7	77,9 $\pm$ 3,3
NIC	28,0 $\pm$ 1,9 (86)	49,4 $\pm$ 2,7 (108)	77,4 $\pm$ 3,6 (99)
COT	29,3 $\pm$ 1,8 (90)	51,1 $\pm$ 3,0 (112)	80,5 $\pm$ 2,1(103)
PEITC	28,0 $\pm$ 1,7 (86)	49,0 $\pm$ 1,4 (108)	76,9 $\pm$ 2,2 (99)
Kontrolle	31,5 $\pm$ 2,0	45,8 $\pm$ 2,3	77,3 $\pm$ 2,2
NRN	27,3 $\pm$ 0,5 (87)	49,9 $\pm$ 1,0 (109)	77,2 $\pm$ 0,9 (100)
AT	30,9 $\pm$ 1,2 (98)	45,8 $\pm$ 1,4 (100)	76,7 $\pm$ 0,6 (99)
AB	31,9 $\pm$ 1,1 (101)	46,1 $\pm$ 1,4 (101)	78,0 $\pm$ 1,0 (101)
MYO	31,4 $\pm$ 0,4 (100)	47,5 $\pm$ 0,7 (104)	78,9 $\pm$ 0,7 (102)
NAT	32,6 $\pm$ 0,9 (103)	47,3 $\pm$ 0,2 (103)	79,9 $\pm$ 0,7 (103)
NAB	32,2 $\pm$ 0,9 (102)	47,2 $\pm$ 0,2 (103)	79,5 $\pm$ 0,8 (103)

## 5 Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman, S. Z., Salama, S. A., Au, W. W., Hamada, F. A., 2000. Role of polymorphic *CYP2E1* and *CYP2D6* genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes. *Pharmacogenetics* 10, 239-249.
- Adams, J. D., Lee, S. J., Vinchkoski, N., Castonguay, A., Hoffmann, D., 1983. On the formation of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone during smoking. *Cancer Lett.* 17, 339-346.
- Airoidi, L., Orsi, F., Magagnotti, C., Coda, R., Randone, D., Casetta, G., Peluso, M., Hautefeuille, A., Malaveille, C., Vineis, P., 2002. Determinants of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in bladder cancer biopsies. *Carcinogenesis* 23, 861-866.
- Akermann, S., 1994. Todesursachenstatistik (I). *Versicherungsmedizin* 46, 88-91.
- Akkan, Z., Preussmann, R., Spiegelhalder, B., 1991. N-nitrosamines in ambient air of industrial areas in Germany. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 117, S14.
- Albanes, D., Heinonen, O. P., Taylor, P. R., Virtamo, J., Edwards, B. K., Rautalahti, M., Hartman, A. M., Palmgren, J., Freedman, L. S., Haapakoski, J., Barrett, M. J., Pietinen, P., Malila, N., Tala, E., Liippo, K., Salomaa, E.-R., Tangrea, J. A., Teppo, L., Askin, F. B., Taskinen, E., Erozán, Y., Greenwald, P., Huttunen, J. K., 1996.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1560-1570.
- Ambrose, A. M., DeEds, F., 1946. Some comparative observations on *l*-nicotine and myosmine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 63, 423-424.
- Andersen, R. A., Burton, H. R., Fleming, P. D., Hamilton-Kemp, T. R., 1989. Effect of storage conditions on nitrosated, acylated, and oxidized pyridine alkaloid derivatives in smokeless tobacco products. *Cancer Res.* 49, 5895-5900.
- Anon (1981). The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds, National Academy of Sciences National Press, Washington DC.
- Anon (1986). Tobacco Smoking, IARC Monograph Vol. 38, IARC, Lyon.
- Anon (1997). Passivrauchen am Arbeitsplatz. In: DFG (Ed.) Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten.
- Anon (1998). National Cancer Institute fact book, National Cancer Institute, US Department of Health.
- Anon (2002). Krebs in Deutschland, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken.
- Ardies, C. M., Smith, T. J., Kim, S. B., Yang, C. S., 1996. Induction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) activation in rat lung microsomes by chronic ethanol consumption and repeated running exercise. *Cancer Lett.* 103, 209-218.
- Armstrong, R. W., Borman, B., 1996. Trends in incidence rates of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in New Zealand, 1978-1992. *Int. J. Epidemiol.* 25, 941-947.
- Ashley, D. L., Beeson, M. D., Johnson, D. R., McCraw, J. M., Richter, P., Pirkle, J. L., Pechacek, T. F., Song, S., Watson, C. H., 2003. Tobacco-specific nitrosamines in tobacco from US brand and non-US brand cigarettes. *Nicotine Tobacco Res.* 5, 323-331.
- Atawodi, S. E., Lea, S., Nyberg, F., Mukeria, A., Constantinescu, V., Ahrens, W., Brueske-Hohlfeld, I., Fortes, C., Boffetta, P., Friesen, M. D., 1998. 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-

- butanone-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to tobacco smoke: validation of a method to be used in multicenter studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 817-821.
- Auterhoff, H., Knabe, J., Hölzje, H. D. (1991). *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Bartsch, H., Ohshima, H., Pignatelli, B., 1988. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat. Res.* 202, 307-324.
- Beach, A. C., Gupta, R. C., 1992. Human biomonitoring and the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13, 1053-1074.
- Becker, N., Muscat, J. E., Wynder, E. L., 2001. Cancer mortality in the United States and Germany. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 293-300.
- Beckett, A. H., Gorrod, J. W., Jenner, P., 1971. A possible relation between pKa1 and lipid solubility and the amounts excreted in urine of some tobacco alkaloids given to man. *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 115-120.
- Benowitz, N. L., 1996. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* 18, 188-204.
- Berlin, A., Draper, M., Hemminki, K., Vainio, H., 1984. Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents. *IARC Sci. Publ.* 59, 325-427.
- Block, G., 1991. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 270s-282s.
- Blot, W. J., 1992. Alcohol and cancer. *Cancer Res.* 52, 2119s-2123s.
- Blot, W. J., Chow, W.-H., McLaughlin, J. K., 1996. Tea and cancer: a review of the epidemiological evidence. *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 425-438.
- Bofetta, P., Agudo, A., Ahrens, W., Benhamou, E., Benhamou, S., Darby, S. C., Ferro, G., Fortes, C., Gonzales, C. A., Jockel, K. H., Krauss, M., Kreienbrock, L., Kreuzer, M., Mendes, A., Merletti, F., Nyberg, F., Pershagen, G., Pohlabeln, H., Riboli, E., Schmid, G., Simonato, L., Tredaniel, J., Whitley, E., Wichmann, H. E., Saracci, R., 1998. Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1440-1450.
- Bosetti, C., La Vecchia, C., Talamini, R., Simonato, L., Zambon, P., Negri, E., Trichopoulos, D., Lagiou, P., Bardini, R., Franceschi, S., 2000. Food groups and risk of squamous cell esophageal cancer in northern Italy. *Int. J. Cancer* 87, 289-294.
- Bouchard, L., Castonguay, A., 1993. Inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in mouse lung explants. *Drug Metab. Dispos.* 21, 293-298.
- Bouchardy, C., Benhamou, S., Jourenkova, N., Dayer, P., Hirvonen, A., 2001. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer* 32, 109-112.
- Boysen, G., Kenney, P. M. J., Upadhyaya, P., Wang, M., Hecht, S. S., 2003. Effects of benzyl isothiocyanate and 2-phenethyl isothiocyanate on benzo[a]pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolism in F-344 rats. *Carcinogenesis* 24, 517-525.
- Braga, C., La Vecchia, C., Franceschi, S., Negri, E., Parpinel, M., Decarli, A., Giacosa, A., Trichopoulos, D., 1998. Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma. *Cancer* 82, 448-453.

- Brandänge, S., Lindblom, L., 1976. *N*-Vinyl as N-H protection group. A convenient synthesis of myosmine. *Acta Chem. Scand.* 30, 39.
- Brandänge, S., Rodriguez, B., 1983. Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem. Scand. Ser. B* 37, 643-644.
- Branner, B., Kutzer, C., Zwickenpflug, W., Scherer, G., Heller, W.-D., Richter, E., 1998. Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and non-smoking women. *Biomarkers* 3, 35-47.
- Bridges, B. A., Butterworth, B. E., Weinstein, I. B., 1982. Indicators of genotoxic exposure. *Banbury Report* 13, 277-558.
- Brittebo, E., Tjälve, H., 1980. Autoradiographic observations on the distribution and metabolism of N'-[14C]nitrosonornicotine in mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 98, 233-242.
- Brittebo, E. B., Tjälve, H., 1981. Formation of tissue-bound N'-nitrosonornicotine metabolites by the target tissues of Sprague-Dawley and Fisher rats. *Carcinogenesis* 2, 959-963.
- Brown, B., Avalos, J., Lee, C., Doolittle, D., 2001a. The effect of tobacco smoke, nicotine, and cotinine on the mutagenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). *Mutat. Res.* 494, 21-29.
- Brown, B. G., Chang, C.-J., Ayres, P. H., Lee, C. K., Doolittle, D. J., 1999. The effect of cotinine or cigarette smoke co-administration on the formation of O<sup>6</sup>-methylguanine adducts in the lung and liver of A/J mice treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Toxicol. Sci.* 47, 33-39.
- Brown, B. G., Richter, E., Tricker, A. R., Ayres, P. H., Doolittle, D. J., 2001b. The effect of a 2-h exposure to cigarette smoke on the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mice. *Chem. Biol. Interact.* 138, 125-135.
- Brunnemann, K. D., Hoffmann, D., 1991. Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit. Rev. Toxicol.* 21, 235-240.
- Brunnemann, K. D., Qi, J., Hoffmann, D., 2002. Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1699-1703.
- Bryant, M. S., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R., Maclure, M., 1987. Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers. *Cancer Res.* 47, 602-608.
- Bush, L.P., Fannin, F.F., Chelvarajan, R.L., Burton, H.R., 1993. Biosynthesis and metabolism of nicotine and related alkaloids. In: Gorrod, J.W., Wahren, J. (Eds.) *Nicotine and related alkaloids: absorption, distribution, metabolism and excretion*. Chapman & Hall, London, pp. 1-30.
- Bytzer, P., Christensen, P. B., Damkier, P., Vinding, K., Seersholm, N., 1999. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 86-91.
- Caldwell, W. S., Greene, J. M., Dobson, G. P., deBethizy, J. D., 1993. Intra gastric nitrosation of nicotine is not a significant contributor to nitrosamine exposure. *Ann. NY Acad. Sci. USA* 686, 213-228.
- Cameron, A. J., 2002. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis. Esophagus* 15, 106-108.

- Carmella, S. G., Hecht, S. S., 1987. Formation of hemoglobin adducts upon treatment of F344 rats with the tobacco-specific nitrosamines 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N'-nitrosonornicotine. *Cancer Res.* 47, 2626-2630.
- Carmella, S. G., Kagan, S. S., Kagan, M., Foiles, P. G., Palladino, G., Quart, A. M., Quart, E., Hecht, S. S., 1990. Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff-dippers, smokers, and non-smokers. *Cancer Res.* 50, 5438-5445.
- Castellsagué, X., Muñoz, N., de Stefani, E., Victora, C. G., Castelletto, R., Rolón, P. A., Quintana, M. J., 1999. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int. J. Cancer* 82, 657-664.
- Castonguay, A., Rivenson, A., Trushin, N., Reinhardt, J., Spathopoulos, S., Weiss, C. H., Reiss, B., Hecht, S. S., 1984. Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of N'-nitrosonornicotine in F344 rats. *Cancer Res.* 44, 2285-2290.
- Castonguay, A., Rossignol, G., 1992. Modulation of the activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by hamster liver microsomes to protein alkylating species. *Toxicol. in Vitro* 6, 397-404.
- Castro, A., Monji, N., 1986. Dietary nicotine and its significance in studies on tobacco smoking. *Biomed. Arch.* 2, 91-97.
- Challis, B. C., Trew, D. F., Guthrie, W. G., Roper, D. V., 1995. Reduction of nitrosamines in cosmetic products. *Cosmet. Sci.* 17, 119-131.
- Charest, M., Rossignol, G., Castonguay, A., 1989. In vitro and in vivo modulation of the bioactivation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in hamster lung tissues. *Chem. Biol. Interact.* 71, 265-278.
- Chatenoud, L., La Vecchia, C., Franceschi, S., Tavani, A., Jacobs, D. R., Parpinel, M. T., Soler, M., Negri, E., 1999. Refined-cereal intake and risk of selected cancers in Italy. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 1107-1110.
- Chen, C. B., Hecht, S. S., Hoffmann, D., 1978. Metabolic  $\alpha$ -hydroxylation of the tobacco-specific carcinogen, N'-nitrosonornicotine. *Cancer Res.* 38, 3639-3645.
- Chen, H., Ward, M. H., Graubard, B. I., Heineman, E. F., Markin, R. M., Potischman, N. A., Russell, R. B., Weisenburger, D. D., Tucker, K. L., 2002. Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 137-144.
- Chow, W. H., Blot, W. J., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Gammon, M. D., Stanford, J. L., et al., 1998. Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 150-155.
- Chung, F.-L., Juchatz, A., Vitarius, J., Hecht, S. S., 1984. Effects of dietary compounds on  $\alpha$ -hydroxylation of N-nitrosopyrrolidine and N'-nitrosonornicotine in rat target tissues. *Cancer Res.* 44, 2924-2928.
- Craddock, V. M., 1992. Aetiology of oesophageal cancer: Some operative factors. *Eur. J. Cancer Prev.* 1, 89-103.
- Craddock, V. M. (1993). *Cancer of the esophagus: Approaches to the etiology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Crespi, C. L., Penman, B. W., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J., 1991. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis* 12, 1197-1201.

- Dai, Q., Zheng, W., Ji, B. T., Shu, X. O., Jin, F., Cheng, H. X., et al., 1997. Prior immunity-related medical conditions and oesophageal cancer risk: a population-based case-control study in Shanghai. *Eur. J. Cancer Prev.* 6, 152-157.
- Davis, R. A., Stiles, M. F., deBéthizy, J. D., Reynolds, J. H., 1991. Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Food Chem. Toxicol.* 29, 821-827.
- Dawson, B. A., Lawrence, R. C., 1987a. Analysis of piperazine drug formulations for N-nitrosamines. *J. AOAC Int.* 80, 840-841.
- Dawson, B. A., Lawrence, R. C., 1987b. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *J. AOAC Int.* 80, 554-556.
- Dawson, R. F., 1951. Alkaloid biogenesis. III. Specificity of the nicotinenornicotine conversion. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 4218-4221.
- Dawson, R. F., Christman, D. R., D'Adamo, A., Solt, M. L., Wolf, A. P., 1960a. Biosynthesis of nicotine from isotopically labeled nicotine acids. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2628-2633.
- Dawson, R. F., Christman, D. R., Solt, M. L., Wolf, A. P., 1960b. The biosynthesis of nicotine from nicotinic acid: chemical and radiochemical yields. *Arch. Biochem. Biophys.* 91, 144-150.
- Dawson, R. F., Osdene, T. S., 1972. Speculative view of tobacco alkaloid biosynthesis. *Recent Adv. Phytochem.* 5, 317-338.
- DeMeester, T. R., Peters, J. H., Bremner, C. G., Chandrasoma, P., 1999. Biology of gastroesophageal reflux disease: pathophysiology relating to medical and surgical treatment. *Annu. Rev. Med.* 50, 469-506.
- Devesa, S. S., Blot, W. J., Fraumeni, J. F., 1998. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83, 2049-2053.
- Dewey, L. J., Byerrum, R. U., Ball, C. D., 1955. Biosynthesis of the pyrrolidine ring of nicotine. *Biochem. Biophys. Acta* 18, 141-142.
- Dietrich, M., Meger, M., Meger-Kossien, I., Scherer, G., Tricker, A. R., Adlkofer, F., 1996. Exposure to N-nitrosamines in a rubber processing factory. *Eur. J. Cancer Prev.* 5 Supplement, 156.
- Djordjevic, M. V., Brunnemann, K. D., Hoffmann, D., 1989a. Identification and analysis of a nicotine-derived N-nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco. *Carcinogenesis* 10, 1725-1731.
- Djordjevic, M. V., Gay, L. S., Bush, L. P., Chaplin, J. F., 1989b. Tobacco-specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco alkaloid isolines. *J. Agric. Food Chem.* 37, 752-756.
- Doll, R., 1996. Nature and nurture: possibilities for cancer control. *Carcinogenesis* 17, 177-184.
- Domellöf, L., Andersson, M., Tjälve, H., Veals, S., Trushin, N., Hecht, S. S., 1987. Distribution and metabolism of N'-nitrosonornicotine in the miniature pig. *Carcinogenesis* 8, 1741-1747.
- Domino, E. F., Hornbach, E., Demana, T., 1993a. Relevance of nicotine content of common vegetables to the identification of passive tobacco smokers. *Med. Sci. Res.* 21, 571-572.
- Domino, E. F., Hornbach, E., Demana, T., 1993b. To the Editor. The nicotine content of common vegetables. *New Engl. J. Med.* 369, 437.

- Dragstedt, L. O., 1994. Disposition, bioactivation and DNA binding of food mutagens. The development of a strategy for immunoassay biomarkers. Ph.D. Thesis, Institute of Pharmacology, University of Copenhagen, Denmark.
- Duffield, A. M., Budzikiewicz, H., Djerassi, C., 1965. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXII. A study of the fragmentation process of some tobacco alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2926-2932.
- Edwards, W. B., 1975. The synthesis of pyridyl and picolyl cyclopropyl ketones. *J. Heterocycl. Chem.* 12, 413-416.
- Ehrenberg, L., Hiesche, K. D., Osterman-Golkar, S., Wennberg, I., 1974. Evaluation of genetic risks of alkylating agents: tissue doses in the mouse from air contaminated with ethylene oxide. *Mutat. Res.* 24, 83-103.
- Eisenbrand, G. (1981). *N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Eisenbrand, G., Metzler, M. (1994). *Toxikologie für Chemiker*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Fadlallah, S., Cooper, S. F., Perrault, G., Truchon, G., Lesage, J., 1996. *N*-nitroso compounds in the ambient air of metal factories using metal-working fluids. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 867-874.
- Falter, B., Kutzer, C., Richter, E., 1994. Biomonitoring of hemoglobin adducts - aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin. Investig.* 72, 364-371.
- Fan, T. Y., Morrison, J., Rounbehler, D. P., Ross, R., Fine, D. H., Miles, W., Sen, N. P., 1977. *N*-nitrosodiethanolamine in synthetic cutting fluids; a part-per-hundred impurity. *Science* 197, 70-71.
- Ferlay, J., Bray, F., Sankila, R., Parkin, M. D. (1999). *EUCAN: Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union 1995*, IARC Press, Lyon.
- Fernandez, E., Chatenoud, L., La Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., 1999. Fish consumption and cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 85-90.
- Fischer, S., Spiegelhalder, B., Eisenbarth, J., Preussmann, R., 1990. Investigations on the origin of tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke of cigarettes. *Carcinogenesis* 11, 723-730.
- Franceschi, S., Bidoli, E., Negri, E., Zambon, P., Talamini, R., Ruol, A., Parpinel, M., Levi, F., Simonato, L., La Vecchia, C., 2000. Role of macronutrients, vitamins and minerals in the aetiology of squamous-cell carcinoma of the oesophagus. *Int. J. Cancer* 86, 626-631.
- Franceschi, S., Levi, F., Negri, E., Fassina, A., La Vecchia, C., 1991. Diet and thyroid cancer: a pooled analysis of four European case-control studies. *Int. J. Cancer* 48, 395-398.
- Franceschi, S., Russo, A., La Vecchia, C., 1998. Carbohydrates, fat and cancer of the breast and colon-rectum. *J. Epidemiol. Biostat.* 3, 217-218.
- Franke, W. (1992). *Naturpflanzenkunde*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- French, F. A., Freedlander, B. L., Furst, A., 1957. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2, 205.
- Friesen, J. B., Leete, E., 1990. Nicotine synthase. An enzyme from *Nicotiana* species which catalyzes the formation of (2)-nicotine from nicotinic acid and 1-methyl- $\Delta'$ -pyrrolinium chloride. *Tetrahedron Lett.* 31, 6295-6298.



- Friesen, M. D., Kaderlik, K., Lin, D. X., Garren, L., Bartsch, H., Lang, N. P., Kadlubar, F. F., 1994. Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography electron capture mass spectrometry: validation by comparison with <sup>32</sup>P-postlabeling. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 733-739.
- Geddes, M., Balzi, D., Tomatis, L., 1994. Progress in the fight against cancer in EC countries: changes in mortality rates, 1970-90. *Eur. J. Cancer Prev.* 3, 31-44.
- Glas, S., 2003. Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Glenn, D. F., Edwards, W. B., 1978. Synthesis and mass spectrometry of some structurally related nicotinoids. *J. Org. Chem.* 43, 2860-2870.
- Gorrod, J.W., 1999. Biotransformation of nicotine in mammalian systems. In: Gorrod, J.W., Jacob, P. (Eds.) *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 45-67.
- Griciute, L., Castegnaro, M., Béréziat, J. C., Cabral, J. R. P., 1986. Influence of ethylalcohol on the carcinogenic activity of *N*-nitrosonornicotine. *Cancer Lett.* 31, 267-275.
- Groth, U., Neumann, H. G., 1971. The relevance of chemico-biological interactions for the toxic and carcinogenic effects of aromatic amines (V), the pharmacokinetics of related aromatic amines in blood. *Chem. Biol. Interactions* 4, 409-419.
- Guo, Z., Smith, T. J., Wang, E., Eklind, K. I., Chung, F.-L., Yang, C. S., 1993. Structure-activity relationships of arylalkyl isothiocyanates for the inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone metabolism and the modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes in rats and mice. *Carcinogenesis* 14, 1167-1173.
- Gupta, R. C., 1984. Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6943-6947.
- Gupta, R. C., Reddy, M. V., Randerath, K., 1982. <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 3, 1081-1092.
- Hansen, S., Wiig, J. N., Giercksky, K. E., Tretli, S., 1997. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992. *Int. J. Cancer* 71, 340-344.
- Harris, C. C., 1985. Detection of benzo[*a*]pyrene diol epoxide DNA adducts in peripheral lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 6662-6676.
- Hecht, S. S., 1998. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 559-603.
- Hecht, S. S., 2002. Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis* 23, 907-922.
- Hecht, S. S., Chen, C. B., Dong, M., Ornaf, R. M., Hoffmann, D., Tso, T. C., 1977. Chemical studies on tobacco smoke LI: studies on non-volatile nitrosamines in tobacco. *Beitr. Tabakforsch.* 9, 1-6.
- Hecht, S. S., Chen, C. B., Ohmori, T., Hoffmann, D., 1980a. Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, *N*'-nitrosonornicotine and 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 40, 298-302.

- Hecht, S. S., Chen, C.-H., Hoffmann, D., 1980b. Metabolic  $\beta$ -hydroxylation and N-oxidation of *N*'-nitrosonornicotine. *J. Med. Chem.* 23, 1175-1178.
- Hecht, S. S., Chen, C.-H. B., Young, R., Hoffmann, D., 1981a. Mass spectra of tobacco alkaloid-derived nitrosamines, their metabolites, and related compounds. *Beitr. Tabakforsch.* 11, 57-66.
- Hecht, S. S., Hatsukami, D. K., Bonilla, L. E., Hochalter, J. B., 1999. Quantitation of 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanoic acid and enantiomers of 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in human urine: a substantial pathway of nicotine metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 172-179.
- Hecht, S. S., Hoffmann, D., 1989. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv.* 8, 273-294.
- Hecht, S. S., Lin, D., Chen, C. B., 1981b. Comprehensive analysis of urinary metabolites of *N*'-nitrosonornicotine. *Carcinogenesis* 2, 833-838.
- Hecht, S. S., Morrison, J. B., Wenninger, J. A., 1982. *N*-nitroso-*N*-methyldodecylamine and *N*-nitroso-*N*-methyltetradecylamine in hair-care products. *Food Chem. Toxicol.* 20, 165-169.
- Hecht, S. S., Rivenson, A., Braley, J., DiBello, J. A., Dams, J. D., Hoffmann, D., 1986. Induction of oral cavity tumors in F344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff. *Cancer Res.* 46, 4162-4166.
- Hecht, S. S., Young, R., 1982. Regiospecificity in the metabolism of homologous cyclic nitrosamines, *N*'-nitrosonornicotine and *N*'-nitrosoanabasine. *Carcinogenesis* 3, 1195-1199.
- Hecht, S. S., Young, R., Chen, C. B., 1980c. Metabolism in the F344 rat of 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific carcinogen. *Cancer Res.* 40, 4144-4150.
- Hecht, S. S., Young, R., Maeura, Y., 1983. Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of *N*'-nitrosonornicotine and *N*'-nitrosonornicotine-1-*N*-oxide. *Cancer Lett.* 20, 333-340.
- Henderson, R. F., Bechtold, W. E., Bond, J. A., Sun, J. D., 1989. The use of biological markers in toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 65-82.
- Hoffmann, D., Brunnemann, K. D., Prokopczyk, B., Djordjevic, M. V., 1994. Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J. Toxicol. Environ. Health* 41, 1-52.
- Hoffmann, D., Castonguay, A., Rivenson, A., Hecht, S. S., 1981. Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*'-nitrosonornicotine in Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* 41, 2386-2393.
- Hoffmann, D., Dong, M., Hecht, S. S., 1977. Origin in tobacco smoke of *N*'-nitrosonornicotine, a tobacco-specific carcinogen: brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1841-1844.
- Hoffmann, D., Hecht, S.S., 1990. Advances in tobacco carcinogenesis. In: Cooper, C.S., Grover, P.L. (Eds.) *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 63-102.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I., 1997. The changing cigarette, 1950-1995. *J. Toxicol. Environ. Health* 50, 307-364.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I., El-Bayoumy, K., 2001. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 767-790.

- Hoffmann, D., Raineri, R., Hecht, S. S., Maronpot, R., Wynder, E. L., 1975. A study of tobacco carcinogenesis. XIV. Effects of *N*'-nitrosornicotine and *N*'-nitrosoanabasine in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 977-981.
- Hoffmann, D., Rivenson, A., Amin, S., Hecht, S. S., 1984. Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines in F344 rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108, 81-86.
- Hölzle, D., 2003. Bestimmung von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in Abhängigkeit von Rauchstatus und Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hong, J.-Y., Ding, X., Smith, T. J., Coon, M. J., Yang, C. S., 1992. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific carcinogen, by rabbit nasal microsomes and cytochrome P450s NMa and NMb. *Carcinogenesis* 13, 2141-2144.
- Hu, M. W., Bondinell, W. E., Hoffmann, D., 1974. Chemical studies on tobacco smoke XXIII. Synthesis of carbon-14 labelled myosmine, nornicotine and *N*'-nitrosornicotine. *J. Labelled Compd.* 10, 79-88.
- Iijima, K., Henry, E., Moriya, A., Wirz, A., Kelman, A. W., McColl, K. E. L., 2002. Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* 122, 1248-1257.
- Jackanicz, T. M., Byerrum, R. U., 1966. Incorporation of aspartate and malate into the pyridine ring of nicotine. *J. Biol. Chem.* 241, 1296-1299.
- Jankowiak, R., Ariese, F., Hewer, A., Luch, A., Zamzow, D., Hughes, N. C., Phillips, D., Seidel, A., Platt, K.-L., Oesch, F., Small, G. J., 1998. Structure, conformations, and repair of DNA adducts from dibenzo[*a,l*]pyrene: <sup>32</sup>P-postlabeling and fluorescence studies. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 674-685.
- Jenkins, R. A., Palausky, A., Counts, R. W., Bayne, C. K., Dindal, A. B., Guerin, M. R., 1996. Exposure to environmental tobacco smoke in sixteen cities in the United States as determined by personal breathing zone air sampling. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.* 6, 473-502.
- Jiao, D., Eklind, K. I., Choi, C.-I., Desai, D. H., Amin, S. G., Chung, F.-L., 1994. Structure-activity relationships of isothiocyanates as mechanism-based inhibitors of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Res.* 54, 4327-4333.
- Jiao, D., Smith, T. J., Kim, S. B., Yang, C. S., Desai, D., Amin, S., Chung, F.-L., 1996. The essential role of the functional group in alkyl isothiocyanates for inhibition of tobacco nitrosamine-induced lung tumorigenesis. *Carcinogenesis* 17, 755-759.
- Kadlubar, F. F., 1994. Biochemical individuality and its implications for drug and carcinogen metabolism: recent insights from acetyltransferase and cytochrome P4501A2 phenotyping and genotyping in humans. *Drug Metab. Rev.* 26, 37-46.
- Kamp, E., Eisenbrand, G., 1991. Long-chain *N*-nitroso-*N*-methylalkylamines in commercial cosmetics, light-duty dishwashing, liquids and household cleaning preparations. *Food Chem. Toxicol.* 29, 203-209.
- Katiyar, S. K., Mukhtar, H., 1996. Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies (review). *Int. J. Oncol.* 8, 221-238.

- Khesina, A. Y., Kolyadich, M. N., Krivosheyeva, A., Sokolskaya, N. N., Shcherbak, N. P., Levinsky, S. S., 1996. Assessment of pollution of the Moscow city air with carcinogenic PAH and *N*-nitrosamines. *Expt. Oncol.* **18**, 14-18.
- Kisaki, T., Maeda, S., Koiwai, A., Mikami, Y., Sasaki, T., Matsushita, H., 1978. Transformation of tobacco alkaloids. *Beitr. Tabakforsch. Int.* **9**, 308-316.
- Kisaki, T., Tamaki, E., 1966. Phytochemical studies of the tobacco alkaloids. X. Degradation of the tobacco alkaloids and their optical rotary changes in tobacco plants. *Phytochem.* **5**, 293-300.
- Kleinsasser, N. H., Wallner, B. C., Harréus, U. A., Zwickenspflug, W., Richter, E., 2003. Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* **192**, 171-177.
- Klimisch, H. J., Stadler, L., 1976. Investigations of *N*-nitrosonornicotine from nicotine-*N'*-oxide. *Talanta* **23**, 614-616.
- Koehl, W., Eisenbrand, G., 1999. *N*-nitroso compounds. In: Marquardt, H., Schäfer, S., McClellan, R., Welsch, F. (Eds.) *Toxicology*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokio, Toronto
- Korte, F., Schulze-Steinen, H.-J., 1962. Umlagerung von  $\alpha$ -Aroyl-pyrrolidonen in konz. Salzsäure zu Pyrrolinderivaten. *Chem. Ber.* **95**, 2444-2452.
- Krull, I. S., Goff, V., Silvergleid, A., Fine, D. H., 1979. *N*-nitroso compounds contaminants in prescription and non-prescription drugs. *Arzneimittelforsch.* **29**, 870-874.
- Kushida, H., Fujita, K.-I., Suzuki, A., Yamada, M., Endo, T., Nohmi, T., Kamataki, T., 2000. Metabolic activation of *N*-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis* **21**, 1227-1232.
- Kutzer, C., Richter, E., Oehlmann, C., Atawodi, S.E., 1995. Effect of nicotine and cotinine on NNK metabolism in rats. In: Clarke, P.B.S., Quik, M., Adlkofer, F., Thurau, K. (Eds.) *Effects of Nicotine on Biological Systems II*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, pp. 385-390.
- La Vecchia, C., Chatenoud, L., Franceschi, S., et al., 1999. Vegetables and fruit and human cancer: update of an Italian study. *Int. J. Cancer* **82**, 151-152.
- La Vecchia, C., Levi, F., Franceschi, S., et al., 2000. Epidemiology of cancer with focus on Europe. *J. Epidemiol. Biostat.* **5**, 31-47.
- Lagergren, J., Bergström, R., Lindgren, A., Nyrén, O., 2000. The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int. J. Cancer* **85**, 340-346.
- Lagergren, J., Bergström, R., Nyrén, O., 1999. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann. Intern. Med.* **130**, 883-890.
- Launoy, G., Milan, C., Day, N. E., Faivre, J., Pienkowski, P., Gignoux, M., 1997. Oesophageal cancer in France: potential importance of hot alcoholic drinks. *Int. J. Cancer* **71**, 917-923.
- Leete, E., 1955. Biogenesis of nicotine. *Chem. Ind. (London)* 537.
- Leete, E., 1977. Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. *Recent Adv. Chem. Comp. Tob. Tob. Smoke* 365-388.

- Leete, E., 1984. The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic-pathway in *Nicotiana tabacum*. Beitr. Tabakforsch. Int. 12, 113-116.
- Leete, E., Chedekel, M. R., 1972. Aberrant syntheses in higher plants. II. Aberrant formation of (-)-N-methylanabasine from N-methyl- $\Delta^1$ -piperdeinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. Phytochem. 11, 2751-2756.
- Leete, E., Chedekel, M. R., 1974. Metabolism of nicotine in *Nicotiana glauca*. Phytochem. 13, 1853-1859.
- Leete, E., Chedekel, M. R., Bodem, G. B., 1972. Synthesis of myosmine and nornicotine, using an acyl carbanion equivalent as an intermediate. J. Org. Chem. 37, 4465-4466.
- Levi, F., La Vecchia, C., Gulie, C., Negri, E., 1993. Dietary factors and breast cancer risk in Vaud, Switzerland. Nutr. Cancer 19, 327-335.
- Levi, F., Pasche, C., Lucchini, F., Chatenoud, L., Jacobs, D. R., La Vecchia, C., 2000. Refined and whole grain cereals and the risk of oral, oesophageal and laryngeal cancer. Eur. J. Clin. Nutr. 54, 487-489.
- Lewalter, J., Korallus, U., 1985. Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. Int. Arch. Occup. Environ. Health 56, 179-196.
- Liabeuf, A., Faivre, J., 1997. Time trends in oesophageal cancer incidence in Cote d'Or (France), 1976-93. Eur. J. Cancer 80, 834-842.
- Lin, K., Shen, W., Shen, Z., Wu, Y., Lu, S., 2002. Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. Int. J. Cancer 102, 207-211.
- Lipp, G., 1965. Definitions of the various smoke streams of a cigarette. Beitr. Tabakforsch. Int. 3, 220-222.
- Löfberg, B., Brittebo, E. B., Tjälve, H., 1982. Localization and binding of N'-nitrosornicotine metabolites in the nasal region and in some other tissues of Sprague-Dawley rats. Cancer Res. 42, 2877-2883.
- Lord, R. V., Law, M. G., Ward, R. L., Giles, G. G., Thomas, R. J., Thursfield, V., 1998. Rising incidence of oesophageal adenocarcinoma in men in Australia. J. Gastroenterol. Hepatol. 13, 356-362.
- Luanratana, O., Griffin, W. J., 1982. Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. Phytochemistry 21, 449-451.
- Machholz, R., Lewerenz, H. J. (1989). Lebensmitteltoxikologie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Magee, P. N., Barnes, J. M., 1956. The production of malignant hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Brit. J. Cancer 10, 114.
- Marquardt, H., 1996. Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 "Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen". DGPT Mitt. 19, 64-65.
- McKennis, H., Schwartz, S. L., Bowman, E. R., 1964a. Alternate routes in the metabolic degradation of the pyrrolidine ring of nicotine. J. Biol. Chem. 239, 3990-3996.
- McKennis, H., Schwartz, S. L., Turnbull, L. B., Tamaki, E., Bowman, E. R., 1964b. The metabolic formation of  $\gamma$ -(3-pyridyl)- $\gamma$ -hydroxybutyric acid and Its possible intermediary role in the mammalian metabolism of nicotine. J. Biol. Chem. 239, 3981-3989.

- Meacham, R. H., Bowman, E. R., McKennis, H., 1972. Additional routes in the metabolism of nicotine to 3-pyridylacetate. *J. Biol. Chem.* 247, 902-908.
- Mirvish, S. S., 1975. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vitro occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31, 325-351.
- Mirvish, S. S., 1995. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 93, 17-48.
- Moriya, A., Grant, J., Mowat, C., Williams, C., Carswell, A., Preston, T., Anderson, S., Iijima, K., McColl, K. E. L., 2002. In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand. J. Gastroenterol.* 37, 253-261.
- Morse, M. A., Amin, S. G., Hecht, S. S., Chung, F.-L., 1989a. Effects of aromatic isothiocyanates on tumorigenicity, O<sup>6</sup>-methylguanine formation, and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Cancer Res.* 49, 2894-2897.
- Morse, M. A., Eklind, K. I., Amin, S. G., Chung, F.-L., 1992. Effect of frequency of isothiocyanate administration on inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary adenoma formation in A/J mice. *Cancer Lett.* 62, 77-81.
- Morse, M. A., Wang, C.-X., Stoner, G. D., Mandal, S., Conran, P. B., Amin, S. G., Hecht, S. S., Chung, F.-L., 1989b. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA adduct formation and tumorigenicity in the lung of F344 rats by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res.* 49, 549-553.
- Morse, M. A., Stoner, G. D., 1993. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 14, 1737-1746.
- Moyana, T. N., Janoski, M., 1996. Recent trends in the epidemiology of esophageal cancer: Comparison of epidermoid- and adenocarcinomas. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26, 480-486.
- Muñoz, N., Plummer, M., Vivas, J., Moreno, V., de Sanjosé, S., Lopez, G., Oliver, W., 2001. A case-control study of gastric cancer in Venezuela. *Int. J. Cancer* 93, 417-423.
- Murphy, S. E., Heiblum, R., 1990. Effect of nicotine and tobacco-specific nitrosamines on the metabolism of N'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by rat oral tissue. *Carcinogenesis* 11, 1663-1666.
- Murphy, S. E., Heiblum, R., Trushin, N., 1990. Comparative metabolism of N'-nitrosornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by cultured F344 rat oral tissue and esophagus. *Cancer Res.* 50, 4685-4691.
- Nakajima, M., Yoshida, R., Shimada, N., Yamazaki, H., Yokoi, T., 2001. Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1110-1113.
- Nandakumar, A., Anantha, N., Pattabhiraman, V., Prabhakaran, P. S., Dhar, M., Puttaswamy, K., Venugopal, T. C., Reddy, N. M., Rajanna, V., Srinivas, A. T., 1996. Importance of anatomical subsite in correlating risk factors in cancer of the oesophagus - report of a case-control study. *Br. J. Cancer* 73, 1306-1311.
- Negri, E., Franceschi, S., Bosetti, C., Levi, F., Conti, E., Parpinel, H., La Vecchia, C., 2000. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int. J. Cancer* 86, 122-127.

- Nestor, T. B., Gentry, J. S., Peele, D. M., Riddick, M. G., Conner, B. T., Edwards, M. E., 2003. Role of oxides of nitrogen in tobacco-specific nitrosamine formation in flue-cured tobacco. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 20, 467-475.
- Neumann, H.-G., 1980. Dose-response relationships in the primary lesion of strong electrophilic carcinogens. *Arch. Toxicol. Suppl.* 3, 69-77.
- Neumann, H.-G., 1984. Dosimetry and dose response relationships. *IARC Sci. Publ.* 59, 115-126.
- Neumann, H.-G., Albrecht, O., van Dorp, C., Zwirner-Baier, I., 1995. Macromolecular adducts caused by environmental chemicals. *Clin. Chem.* 41, 1835-1840.
- Nilsson, R., 1996. Environmental tobacco smoke and lung cancer: a reappraisal. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 34, 2-17.
- O'Connor, J. B., Falk, G. W., Richter, J. E., 1999. The incidence of adenocarcinoma and dysplasia in Barrett's esophagus: report on the Cleveland Clinic Barrett's Esophagus Registry. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2037-2042.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., Cherniack, M. G., Brodtkin, C. A., Hammar, S., 1996. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1550-1559.
- Osterman-Golkar, S., Farmer, P. B., Segerbäck, D., Bailey, E., Calleman, C. J., Svensson, K., Ehrenberg, L., 1983. Dosimetry of ethylene oxide in the rat by quantitation of alkylated histidine in hemoglobin. *Teratogenesis Carcinogen Mut.* 3, 395-405.
- Pakhale, S. S., Maru, G. B., 1998. Distribution of major and minor alkaloids in tobacco, mainstream and sidestream smoke of popular Indian smoking products. *Food Chem. Toxicol.* 36, 1131-1138.
- Pannala, A. S., Mani, A. R., Spencer, J. P. E., Skinner, V., Bruckdorfer, K. R., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A., 2003. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radical Biol. Med.* 34, 576-584.
- Paschke, T., Riefler, M., Schuler-Metz, A., Wolz, L., Scherer, G., McBride, C. M., Bepler, G., 2001. Comparison of *cytochrome P450 2A6* polymorphism frequencies in Caucasians and African-Americans using a new one-step PCR-RFLP genotyping method. *Toxicology* 168, 259-268.
- Pereira, M. A., Chang, L. W., 1981. Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. *Chem. Biol. Interact.* 33, 301-305.
- Perera, F. P., 1988. The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 205, 255-269.
- Peterson, L. A., Predecki, D. P., Thomson, N. M., Villalta, P. W., Donaldson, E. E., 2003. Nucleophilic reactions between thiols and a tobacco specific nitrosamine metabolite, 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 661-667.
- Poirier, M. C., 1994. Human exposure monitoring, dosimetry, and cancer risk assessment: the use of antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen-modified DNA. *Drug Metab. Rev.* 26, 87-109.
- Poirier, M. C., Beland, F. A., 1992. DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 749-755.
- Potter, J. D., 1996. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control* 7, 127-146.

- Potter, J.D., Steinmetz, K., 1996. Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. In: Stewart, B.W., McGregor, D., Kleihues, P. (Eds.) Principles of Chemoprevention. IARC Sci.Pub., pp. 61-90.
- Prokopczyk, B., Rivenson, A., Hoffmann, D., 1991. A study of betel quid carcinogenesis IX. Comparative carcinogenicity of 3-(methylnitrosamino)propionitrile and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone upon local application to mouse skin and rat oral mucosa. *Cancer Lett.* 60, 153-157.
- Reddy, M. V., Gupta, R. C., Randerath, K., 1981. <sup>32</sup>P-base analysis of DNA. *Anal. Biochem.* 117, 271-279.
- Richter, E., 1996a. Haemoglobin adducts of *N*-nitroso compounds. *Eur. J. Cancer Prev.* 5 Suppl 1, 115-119.
- Richter, E., 1996b. Leserbrief zu DGPT Mitt 17:44-50 "Gesundheitsgefährdung durch Passivrauchen". *DGPT Mitt.* 19, 65-66.
- Richter, E., Branner, B., 2002. Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans. *J. Chromatogr. B* 778, 49-62.
- Richter, E., Scherer, G., 2004. Aktives und passives Rauchen. In: Marquardt, H., Schäfer, S.G. (Eds.) Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany, pp. 897-918.
- Richter, E., Tricker, A. R., 1994. Nicotine inhibits the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. *Carcinogenesis* 15, 1061-1064.
- Richter, E., Tricker, A. R., 2002. Effect of nicotine, cotinine and phenethyl isothiocyanate on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) metabolism in the Syrian golden hamster. *Toxicology* 179, 95-103.
- Riebe, M., Westphal, K., 1983. Studies on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by various alkaloids. *Mutat. Res.* 124, 281-286.
- Riebe, M., Westphal, K., Fortnagel, P., 1982. Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat. Res.* 101, 39-43.
- Rioux, N., Castonguay, A., 1998. Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res.* 58, 5354-5360.
- Rogers, M. A. M., Vaughan, T. L., Davis, S., Thomas, D. B., 1995. Consumption of nitrate and nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4, 29-36.
- Romert, L., Curvall, M., Jenssen, D., 1992. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* 7, 349-355.
- Römpp Chemie Lexikon. (1.0). 1995. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Rundlöf, T., Olsson, E., Wiernik, A., Back, S., Aune, M., Johansson, L., Wahlberg, I., 2000. Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of *N*-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4381-4388.
- Runge, D. M., Stock, T. W., Lehmann, T., Taege, C., Bernauer, U., Stolz, D. B., Hofmann, S., Foth, H., 2001. Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. *Arch. Toxicol.* 75, 335-345.



- Sakuma, H., Kusama, M., Yamaguchi, K., Matsuki, T., Sugawara, S., 1984. The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 12, 199-209.
- Sato, M., Tagawa, H., Kosasayama, A., Uchimaro, F., Kojima, H., Yamasaki, T., Sakurai, T., 1978. Psychotropic agents. I. Synthesis of 1-pyridinyl-1-butanones, 1-indolyl-1-butanones and the related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 26, 3296-3305.
- Schepers, G., Rustemeier, K., Walk, R.-A., Hackenberg, U., 1993. Metabolism of S-nicotine in noninduced and Aroclor-induced rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 18, 187-197.
- Scherer, G., Richter, E., 1997. Biomonitoring exposure to environmental tobacco smoke (ETS): a critical reappraisal. *Hum. Exp. Toxicol.* 16, 449-459.
- Schlöbe, D., 2003. Entwicklung einer GC/MS-Analysenmethode zur Bestimmung von 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon-abspaltenden DNA-Addukten für die Untersuchung der endogenen Nitrosierung von Myosmin bei Ratten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schuller, H. M., Castonguay, A., Orloff, M., Rossignol, G., 1991. Modulation of the uptake and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by nicotine in hamster lung. *Cancer Res.* 51, 2009-2014.
- Schulze, J., Schrader, E., Foth, H., Kahl, G. F., Richter, E., 1998. Effect of nicotine or cotinine on metabolism of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, 344-350.
- Segerbäck, D., 1983. Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethane and ethane oxide. *Chem. Biol. Interactions* 45, 139-151.
- Segerbäck, D., 1985. In vivo dosimetry of some alkylating agents as a basis for risk estimation. Ph.D. Thesis, University of Stockholm, Stockholm.
- Sheen, S. J., 1988. Detection of nicotine in foods and plant materials. *J. Food Sci.* 53, 1572-1573.
- Siegmund, B., Leitner, E., Pfannhauser, W., 1999. Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3113-3120.
- Siewert, J. R., Hölscher, A. H., Becker, K., Gössner, W., 1987. Kardiakarzinom: Versuch einer therapeutisch relevanten Klassifikation. *Chirurg* 9, 25-34.
- Siewert, J. R., Stein, H. J., 1996. Adenocarcinoma of the gastroesophageal junction: classification, pathology and extent of resection. *Dis. Esophagus* 9, 173-182.
- Siewert, J. R., Stein, H. J., 1998. Classification of carcinoma of the esophagogastric junction. *Br. J. Surg.* 85, 1457-1459.
- Sisler, E. C., 1969. Determination of myosmine with o-aminobenzaldehyde. *Anal. Biochem.* 31, 183-188.
- Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R., 1990. Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 11, 507-518.
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Rumble, M. A., Rodgman, A., Doolittle, D. J., 2001. "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol.* 39, 183-205.

- Smith, T. J., Guo, Z., Li, C., Ning, S. M., Thomas, P. E., Yang, C. S., 1993. Mechanisms of inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation in mouse by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res.* 53, 3276-3282.
- Smith, T. J., Guo, Z., Thomas, P. E., Chung, F.-L., Morse, M. A., Elkind, K., Yang, C. S., 1990. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes and its inhibition by isothiocyanates. *Cancer Res.* 50, 6817-6822.
- Späth, E., Bretschneider, H., 1928. Eine neue Synthese des Nicotins und einige Bemerkungen zu den Arbeiten Nagais über Ephedrine. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 60, 327-334.
- Spechler, S. J., Lee, E., Ahnen, D., Goyal, R. K., Hirano, I., Ramirez, F., Raufman, J.-P., Sampliner, R., Schnell, T., Sontag, S., Vlahcevic, Z. R., Young, R., Williford, W., 2001. Long-term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease - Follow-up of a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Ass.* 285, 2331-2338.
- Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G., Preussmann, R., 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Chem. Toxicol.* 14, 545-548.
- Spiegelhalder, B., Preussmann, R., 1984. Contamination of toiletries and cosmetic products with volatile and nonvolatile N-nitroso carcinogens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108, 160-163.
- Spiegelhalder, B., Preussmann, R., 1987. Nitrosamines measurements in ambient air of an industrial area in Austria. *IARC Sci. Publ.* 84, 411-414.
- Statistisches Bundesamt (1991). Todesursachenstatistik, Wiesbaden.
- Stephany, R. W., Freudenthal, J., Schuller, P. L., 1978. N-nitroso-5-methyl-1,3-oxazolidine identified as an impurity in a commercial cutting fluid. *J. Royal Neth. Chem. Soc.* 97, 177-178.
- Sticha, K. R. K., Kenney, P. M. J., Boysen, G., Liang, H., Su, X., Wang, M., Upadhyaya, P., Hecht, S. S., 2002. Effects of benzyl isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on DNA adduct formation by a mixture of benzo[a]pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 23, 1433-1439.
- Stoner, G. D., Adams, C., Kresty, L. A., Amin, S. G., Desai, D., Hecht, S. S., Murphy, S. E., Morse, M. A., 1998. Inhibition of N'-nitrosornicotine-induced esophageal tumorigenesis by 3-phenylpropyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 19, 2139-2143.
- Su, T., Bao, Z., Zhang, Q.-Y., Smith, T. J., Hong, J.-Y., Ding, X., 2000. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 60, 5074-5079.
- Swain, M. L., Eisner, A., Woodward, C. F., Brice, B. A., 1949. Ultraviolet absorption spectra of nicotine, nornicotine and some of their derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 1341-1345.
- Tannenbaum, S. R., Weisman, M., Fett, D., 1976. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet. Toxicol.* 14, 549-552.
- Tavani, A., La Vecchia, C., Gallus, S., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Levi, F., Negri, E., 2000. Red meat intake and cancer risk: a study in Italy. *Int. J. Cancer* 86, 425-428.
- Terry, P., Lagergren, J., Hansen, H., Wolk, A., Nyrén, O., 2001. Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. *Eur. J. Cancer Prev.* 10, 365-369.

- Terry, P., Lagergren, J., Wolk, A., Nyrén, O., 2000. Reflux-inducing dietary factors and risk of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Nutr. Cancer* 38, 186-191.
- Törnqvist, M., Osterman-Golkar, S., Kautiainen, A., Näslund, M., Calleman, C. J., Ehrenberg, L., 1988. Methylations in human hemoglobin. *Mutat. Res.* 204, 521-529.
- Tricker, A. R., 1996. Excretion of N-nitrosamines in patients with bacterial bladder infections or diversions of urinary tract. *Eur. J. Cancer Prev.* 5 (Suppl), 95-99.
- Tricker, A.R., Brown, B., Doolittle, D., Richter, E., 2001. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mouse lung and liver and effect of cigarette smoke exposure on in vivo metabolism to biologically reactive intermediates. In: Dansette, P.M., Snyder, R., Delaforge, M., Gibson, G.G., Greim, H., Jollow, D.J., Monks, T.J., Sipes, I.G. (Eds.) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 451-454.
- Trujillo, J. I., Gopalan, A. S., 1993. Facile esterification of sulfonic acids and carboxylic acids with triethylorthoacetate. *Tetrahedron Lett* 34, 7355-7358.
- Trushin, N., Hecht, S. S., 1999. Stereoselective metabolism of nicotine and tobacco-specific N-nitrosamines to 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 164-171.
- Tso, T.C., 1990. Tobacco-specific N-nitrosamines. Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant. Tso TC. Ideal Inc., Beltsville MD USA, pp. 467-486.
- Tso, T. C., Jeffrey, R. N., 1953. Paper chromatography of alkaloids and their transformation products in maryland tobacco. *Arch. Biochem. Biophys.* 43, 269-285.
- Tyroller, S., Zwickenpflug, W., Richter, E., 2002. New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4909-4915.
- Tyroller, S., Zwickenpflug, W., Richter, E., 2003. Synthesis of <sup>14</sup>C-labelled myosmine, [2'-<sup>14</sup>C]-3-(1-pyrrolin-2-yl)pyridine. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 46, 395-400.
- Tzonou, A., Lipworth, L., Garidou, A., Signorello, L. B., Laggiou, P., Hsieh, C., et al., 1996. Diet and risk of esophageal cancer by histologic type in a low-risk population. *Int. J. Cancer* 68, 300-304.
- Upadhyaya, P., Sturla, S. J., Tretyakova, N., Ziegel, R., Villalta, P. W., Wang, M. Y., Hecht, S. S., 2003. Identification of adducts produced by the reaction of 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol with deoxyguanosine and DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 180-190.
- Upadhyaya, P., Zimmerman, C. L., Hecht, S. S., 2002. Metabolism and pharmacokinetics of N'-nitrosonornicotine in the patas monkey. *Drug Metab. Dispos.* 30, 1115-1122.
- van Welie, R. T. H., van Dijck, R. G. J. M., Vermeulen, N. P. E., van Sittert, N. J., 1992. Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarker of electrophilic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 271-306.
- Vermeer, I. T. M. Nitrate exposure and endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. 2000. Department of Health Risk and Analytical Toxicology, Maastricht University, Netherlands.
- Vermeer, I. T. M., Moonen, E. J. C., Dallinga, J. W., Kleinjans, J. C. S., van Maanen, J. M. S., 1999. Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat. Res.* 428, 353-361.
- Waddell, W. J., Marlowe, C., 1980. Localization of [<sup>14</sup>C]nitrosonornicotine in tissues of the mouse. *Cancer Res.* 40, 3518-3523.

- Walters, C. L., Hill, M. J., Rudell, W. S. J., 1978. Gastric juice nitrite. Its source and relationship to hydrogen ion concentration. Environmental aspects of N-nitroso compounds. IARC Sci. Publ. 19, 279-288.
- Wang, L., Lubin, J. H., Zhang, S. R., Metayer, C., Xia, Y., Brenner, A., Shang, B., Wang, Z., Kleinerman, R. A., 2000. Lung cancer and environmental tobacco smoke in a non-industrial area of China. Int. J. Cancer 88, 139-145.
- Wang, M., Cheng, G., Sturla, S. J., Shi, Y., McIntee, E. J., Villalta, P. W., Upadhyaya, P., Hecht, S. S., 2003. Identification of adducts formed by pyridyloxobutylation of deoxyguanosine and DNA by 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a chemically activated form of tobacco specific carcinogens. Chem. Res. Toxicol. 16, 616-626.
- Wang, P., Giese, R. W., 1998. Phosphate-specific fluorescence labeling with BO-IMI: reaction details. J. Chromatogr. A 809, 211-218.
- Wattenberg, L. W., Coccia, J. B., 1991. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. Carcinogenesis 12, 115-117.
- Wattenberg, L. W., Estensen, R. D., 1996. Chemopreventive effects of *myo*-inositol and dexamethasone on benzo[*a*]pyrene and 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary carcinogenesis in female A/J mice. Cancer Res. 56, 5132-5135.
- Weinstein, I. B., 1981. Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis. J. Supramol. Struct. Cell Biochem. 17, 107-128.
- Weinstein, I. B., 1983. The monitoring of DNA adducts as an approach to carcinogen detection. Ann. Rev. Pub. Health 4, 409-413.
- Wenusch, A., 1930. Fachl. Mitt. Österr. Tabakregie 2, 13-15.
- Wieland, E., Neumann, H. G., 1978. Methemoglobin formation and binding to blood constituents as indicators for the formation, availability and reactivity of activated metabolites derived from trans-4-aminostilbene and related aromatic amines. Arch. Toxicol. 40, 17-35.
- Williams, D. L. H. (1988). Nitrosation, Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Wilp, J., Richter, E., Zwicknagl, W., 2002a. Modulation of myosmine nitrosation in human gastric fluid by pH, nitrite and addition of tea components. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 43, 312.
- Wilp, J., Zwicknagl, W., Richter, E., 2002b. Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. Food Chem. Toxicol. 40, 1223-1228.
- Witkop, B., 1954. Infrared diagnosis of the hydrochlorides of organic bases. II. The structure of myosmine. Am. Chem. Soc. 76, 5597-5599.
- Witschi, H., Espiritu, I., Maronpot, R. R., Pinkerton, K. E., Jones, A. D., 1997. The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. Carcinogenesis 18, 2035-2042.
- Wogan, G. N., 1989. Markers of exposure to carcinogens: methods for human biomonitoring. J. Am. Coll. Toxicol. 8, 871-881.
- Woodward, C. F., Eisner, A., Haines, P. G., 1944. Pyrolysis of nicotine to myosmine. J. Am. Chem. Soc. 66, 911-914.

- Wu, Y.-N., Wang, H.-Z., Li, J.-S., Han, C., 1993. The inhibitory effect of Chinese tea and its polyphenols on in vitro and in vivo *N*-nitrosation. *Biomed. Environ. Sci.* **6**, 237-258.
- Xu, G. P., Reed, P. I., 1993. *N*-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method. *Carcinogenesis* **14**, 2547-2551.
- Xu, Y., Ho, C.-T., Amin, S. G., Han, C., Chung, F.-L., 1992. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* **52**, 3875-3879.
- Yang, C. S., Wang, Z.-Y., 1993. Tea and Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 1038-1049.
- Yang, K. S., Gholson, R. K., Waller, G. R., 1965. Studies on nicotine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4184-4188.
- Yoshida, D., 1969a. Effect of agmatine on putrescine formation in tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **10**, 923-924.
- Yoshida, D., 1969b. Formation of putrescine from ornithine and arginine in tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **10**, 393-397.
- Yoshida, D., Mitake, T., 1966. Agmatine and *N*-carbamylputrescine as intermediates in the formation of nicotine by tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **7**, 301-305.
- Zambon, P., Talamini, R., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Negri, E., Tognazzo, S., Simonato, L., Franceschi, S., 2000. Smoking, type of alcoholic beverage and squamous-cell oesophageal cancer in northern Italy. *Int. J. Cancer* **86**, 144-149.
- Zhang, X., Su, T., Zhang, Q.-Y., Gu, J., Caggana, M., Li, H., Ding, X., 2002. Genetic polymorphisms of the human *CYP2A13* gene: identification of single-nucleotide polymorphisms and functional characterization of an Arg257Cys variant. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 416-423.
- Zoltewicz, J. A., Bloom, L. B., Kem, W. R., 1989. Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J. Org. Chem.* **54**, 4462-4468.
- Zwickenpflug, W., 2000. *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosonornicotine). *J. Agric. Food Chem.* **48**, 392-394.
- Zwickenpflug, W., Meger, M., Richter, E., 1998. Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2703-2706.
- Zwickenpflug, W., Tyroller, S., Richter, E., 2004. Metabolism of myosmine in rats: Identification of the main metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* submitted.

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung der Teilnahme an den Konferenzen in Budapest, Washington DC und Orlando sowie die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Publikationen und dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Wolfgang Zwickenspflug danke ich für die sachkundige Einführung in die vielfältige Welt der Analytik, für unzählige fachliche Diskussionen, seine Hilfestellung bei der Lösung unterschiedlichster Probleme und Krisen und die stets fruchtbare Zusammenarbeit.

Den Herren Dr. Bernhard Irlinger und Dr. Holger Lerche danke ich für die Anfertigung von NMR-Spektren bzw. für die Durchführung der LC/MS-Messungen.

Ferner gilt mein Dank den Herren Dr. Florian Huber und Hans-Werner Crößmann vom Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus der Merck KGaA, Grafing für ihre Hilfsbereitschaft bei der Synthese des  $^{14}\text{C}$ -markierten Myosmins.

Bei Frau Christiana Oehlmann und Frau Christine Karrer bedanke ich mich herzlich für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die unkomplizierte Arbeitsatmosphäre.

Auch möchte ich mich bei den Kollegen und Freunden im Arbeitskreis für die vielen anregenden Diskussionen zum Thema und weit darüber hinaus bedanken.

Mein besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern für die Unterstützung und Begleitung meiner Ausbildung.

## LEBENS LAUF

Name:		Tyroller
Vorname:		Stefan
geboren am:		8. März 1976 in Schrobenhausen
Vater:		Anton Tyroller, Schreiner
Mutter:		Christine Tyroller, geb. Maier, Hausfrau
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Schule:	1982-1986	Grund- und Teilhauptschule, Mühlried
	1986-1995	Gymnasium, Schrobenhausen
	Juni 1995	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	1995-1996	Sozialstation Neuburg-Schrobenhausen e.V., Schrobenhausen
Studium:	1996-2001	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	Okt. 1998	Vordiplom Chemie
	Juli 2000	Mündliche Diplomprüfung
	2000-2001	Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, mit Abschluss Diplom-Chemiker Thema: Myosmin-Analytik in Lebensmitteln
Promotion:	ab März 2001	Anfertigung einer experimentellen Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Richter am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Sonstiges:	seit 2002	Associate Member der <i>American Association for Cancer Research</i>